



Organisation  
Mondiale  
de la Santé  
Animale

World  
Organisation  
for Animal  
Health

Organización  
Mundial  
de Sanidad  
Animal

Original: Inglés  
Febrero de 2013

## INFORME DE LA REUNIÓN DE LA COMISIÓN DE NORMAS BIOLÓGICAS DE LA OIE

París, 20–22 de febrero de 2013

La Comisión de Normas Biológicas de la OIE se reunió en la sede de la OIE del 20 al 22 de febrero de 2013. El Dr. Kazuaki Miyagishima, director general adjunto y jefe del departamento Científico y Técnico de la OIE, en nombre del Dr. Bernard Vallat, director general de la OIE, dio la bienvenida a los miembros de la Comisión, a saber: Prof. Vincenzo Caporale, presidente, Dr. Hualan Chen y Dr. Rodolfo Rivero, vicepresidentes, Dra. Beverly Schmitt, Dr. Paul Townsend y Dr. Peter Daniels.

El Dr. Miyagishima puso a la Comisión al tanto del proceso en curso entre la OIE y la FAO<sup>1</sup>, relativo a una posible mayor convergencia entre los centros de referencia de ambas organizaciones. En el inmediato futuro, se añadirá una mención en la lista de Centros de Referencia de la OIE publicada en su ciber sitio para identificar a los centros que están adscritos tanto a la OIE como a la FAO. Además, se está continuando la armonización de los procedimientos para elaborar los informes anuales de los Centros de Referencia de la OIE y de la FAO.

Por lo que respecta a una pregunta que había planteado la Comisión en su reunión anterior, el Dr. Miyagishima indicó que el Consejo de la OIE presentaría un proyecto de resolución en el mes de mayo de los corrientes, por la que se formalizaría el papel del Delegado de la OIE en el procedimiento de reemplazo de los expertos en los Laboratorios de Referencia de la OIE. Según el procedimiento propuesto, las candidaturas serán aprobadas definitivamente por el Consejo en una de sus tres reuniones anuales. Así se simplificaría el proceso, ya que los nuevos expertos podrían ser aprobados, y la lista en línea de Laboratorios de Referencia de la OIE podría ser actualizada, tras cada reunión del Consejo, en lugar de tener que esperar cada año hasta la Sesión General de mayo. El Consejo también presentará proyectos de resoluciones sobre la designación y la retirada de Centros de Referencia.

Actualmente, se publica una edición nueva del *Manual Acuático* en papel cada tres años. Para evitar coincidir con la publicación de las ediciones nuevas del *Manual Terrestre* (cada cuatro años), se ha decidido ampliar el ciclo de publicación del primero en un año (o sea, se publicará una edición nueva cada cuatro años) a partir de 2014. Para ambas publicaciones, se seguirán proponiendo cada año, en la Sesión General, varios capítulos actualizados que, de ser aprobados, serán añadidos a la versión en línea. Por consiguiente, las versiones en línea seguirían siendo las más actuales. El Dr. Miyagishima añadió que se había renunciado a traducir al francés ambos manuales, por falta de fondos, pero que de momento se continuarían las traducciones al español gracias a las contribuciones del gobierno de España.

La publicación de la OIE, *Normas de calidad y directrices para los laboratorios veterinarios: enfermedades infecciosas* (2008), ha sido retirada de la venta, puesto que dos de las cuatro directrices que contenía se habían quedado obsoletas, una de otras dos no tardaría en estar en la misma situación y la última debía ser actualizada. El director general de la OIE había propuesto que la OIE siguiese publicando el manual sin las directrices obsoletas, basándose en el proceso PVS<sup>2</sup> de la OIE para los laboratorios y que los anexos correspondientes se sometiesen a la aprobación de la Comisión.

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

2 PVS: Prestaciones de los Servicios Veterinarios (por sus siglas en inglés)

Por último, el Dr. Miyagishima dio parte a la Comisión de la labor del Comité Consultivo Conjunto de la FAO y la OIE sobre la Peste Bovina, recordando a la Comisión la resolución nº 33: *Papel de la OIE para mantener el mundo libre de peste bovina*, aprobada en mayo de 2012, por la que se recomendaba que se designase un número limitado de Laboratorios de Referencia de la OIE con una distribución geográfica equilibrada. Se aclaró que era facultad de la OIE, y de la Comisión, no del Comité Consultivo Conjunto, evaluar las candidaturas de los laboratorios de referencia y recomendar su aprobación a la Asamblea Mundial, de modo que el mundo disponga de un mejor servicio gracias a una red de Laboratorios de Referencia de la OIE. Así se facilitarían la transferencia de las muestras y aislados de campo de virus de peste bovina, esparcidos por todo el mundo, a un número limitado de instalaciones de contención. El Comité Consultivo Conjunto se iba a reunir en la semana siguiente a la reunión de la Comisión de Normas Biológicas y finalizaría los procedimientos de aprobación de los centros autorizados a recibir el material con virus de peste bovina, vacunas incluidas, y los criterios de aprobación de proyectos de investigación que impliquen virus de peste bovina. Las labores de la OIE y del Comité Consultivo Conjunto serían así complementarias.

## 1. Aprobación del temario

El proyecto de temario fue presentado y aprobado.

El temario y la lista de participantes figuran respectivamente en los [Anexos 1 y 2](#).

## 2. Centros de referencia de la OIE

### 2.1. Candidaturas para la designación como Centro de Referencia de la OIE

La Comisión recomendó la aprobación de las ocho candidaturas siguientes a Centro Colaborador de la OIE y Laboratorio de Referencia de la OIE:

*Centro Colaborador de la OIE para el Control de Calidad de las Vacunas Veterinarias*  
Centro Panafricano de Vacunas Veterinarias de la Unión Africana (AU-PANVAC), P.O. BOX 1746,  
Debre-Zeit, ETIOPIA  
Tel: (+251) 11.433.80.01 / 11.437.12.86; Fax: (+251) 11.433.88.44;  
E-mail: panvac@africa-union.org; panvac@ethionet.et  
Contacto: Dr. Karim Tounkara.

*Laboratorio de Referencia de la OIE para la Estreptococosis Porcina*  
Universidad de Agronomía de Nanjing (NAU), Rama de Laboratorio de Diagnóstico de Estreptococosis  
Porcina (BSSDL), Weigang No.1, Nanjing, Provincia de Jiangsu, CHINA (REPÚBLICA POPULAR)  
Tel./Fax: (+86) 258.439.5328 / 258.439.6517; E-mail: lucp@njau.edu.cn; yaohch@njau.edu.cn  
Web: ssuis.njau.edu.cn, www.chinasscontrol.com  
Experto de referencia designado: Prof. Chengping Lu.

*Laboratorio de Referencia de la OIE para la Teileriosis Ovina*  
Instituto de Investigación Veterinaria de Lanzhou, Academia China de Ciencias Agrarias (CAAS),  
Laboratorio de Control Sanitario de Vectores y Enfermedades Transmitidas por Vector (VVBDC),  
Xujiaping 1, Distrito de Chengguan, Lanzhou, Provincia de Gansu, CHINA (REPÚBLICA POPULAR)  
Tel.: (+86) 931.834.0977 / 931.834.2515; Fax: (+86) 931.834.2681 / 931.834.2515;  
E-mail: yinhong@caas.net.cn  
Web: http://www.chvst.com  
Experto de Referencia Designado: Prof. Hong Yin.

Se tomó nota de que ni la estreptococosis porcina ni la teileriosis ovina figuran en la lista de la OIE, pero pueden ser importantes en la región. La Comisión convino en que, para este tipo de candidaturas, se pedirá al experto de referencia designado que redacte una propuesta de capítulo para el *Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres (Manual Terrestre)*.

*Laboratorio de Referencia de la OIE para la Fiebre Q*  
Anses (Agencia francesa de seguridad sanitaria de los alimentos, el medio ambiente y el trabajo),  
Laboratorio de Sophia-Antipolis, Unidad de Patología de los Rumiantes, 105, route des Chappes, BP  
111, 06902 Sophia-Antipolis, FRANCIA  
Tel.: (+33 [0]4) 92.94.37.00; Fax: (+33 [0]4) 92.94.37.01; E-mail: elodie.rousset@anses.fr  
Experta de Referencia Designada: Dra. Elodie Rousset.

*Centro Colaborador de la OIE para Cultivos Celulares*

Instituto Zooprofiláctico Experimental de Lombardía y Emilia Romagna (IZSLER), Via Bianchi No. 9, 25124 Brescia, ITALIA

Tel.: (+390-30) 229.01; Fax: (+390-30) 242.5251; E-mail: info@izsler.it

Web: <http://www.izsler.it>

Contacto: Dra. Maura Ferrari.

*Laboratorio de Referencia de la OIE para la Fiebre Aftosa*

Instituto Zooprofiláctico Experimental de Lombardía y Emilia Romagna (IZSLER), Via Bianchi No. 9, 25124 Brescia, ITALIA

Tel.: (+390-30) 229.01; Fax: (+390-30) 242.5251; E-mail: info@izsler.it

Web: <http://www.izsler.it>

Experta de Referencia Designada: Dra. Emiliana Brocchi.

*Laboratorio de Referencia de la OIE para la Encefalitis Japonesa*

Laboratorio de Investigación sobre la Rabia, División de Enfermedades Virales, Agencia de Cuarentena e Inspección Fitosanitaria, Animal y Forestal (QIA), Ministerio de Alimentación, Agricultura, Silvicultura y Pesca (MIFAFF), 175 Anyang-ro, Manan-gu, Anyang-si, Gyeonggi-do, 430-757, COREA (REP.)

Tel.: (+82) 31.467.1783; Fax: (+82) 31.467.1797; E-mail: yangdk@korea.kr; ydk40@hanmail.net

Web: <http://www.qia.go.kr/eng/index.asp>

Experto de Referencia Designado: Dr. Dong-Kin Yang.

*Laboratorio de Referencia de la OIE para la gripe porcina*

Agencia de Sanidad Animal y Laboratorios Veterinarios (AHVLA), New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB, Weybridge, REINO UNIDO

Tel.: (+44-1932) 357.339; /Fax: (+44-1932) 357.239; E-mail: ian.brown@ahvla.gsi.gov.uk

Experto de Referencia Designado: Prof. Ian Brown.

Han sido recibidas dos candidaturas de un país americano para Centro Colaborador de la OIE: una para la investigación, el diagnóstico y la capacitación sobre enfermedades bovinas virales, y la otra para la capacitación y el diagnóstico de enfermedades porcinas emergentes. La Comisión reiteró que el propósito de los centros colaboradores es actuar como centros de pericia en una esfera designada específica de competencia relativa a la gestión de cuestiones generales sobre cuestiones sanitarias (“especialidad”). Los laboratorios de referencia actúan como centros de pericia sobre patógenos o enfermedades designadas. Las especialidades propuestas en estas dos candidaturas no correspondían a los términos de referencia de los centros colaboradores. La Comisión propuso que los candidatos eligiesen una o dos enfermedades concretas y presentasen sus candidaturas como laboratorio de referencia para cada una de las enfermedades.

Un país europeo envió una candidatura a centro colaborador para los parásitos transmitidos por los alimentos. La Comisión consideró que las actividades detalladas en la candidatura correspondían más bien a un laboratorio de referencia. También en este caso, se le propuso al candidato que eligiese una o dos enfermedades concretas y volviese a postular, pero como laboratorio de referencia para la enfermedad en cuestión.

Se recibió también una candidatura de un país africano para laboratorio de referencia para la peste equina y la lengua azul. La Comisión propuso que los candidatos presentasen sendas candidaturas para cada enfermedad. El mismo tipo de situación se planteó con la candidatura de un país europeo para laboratorio de referencia para *Chlamydiaceae* (clamidiosis aviar, ovina y caprina). Una vez más, la Comisión propuso que se presentasen dos candidaturas, una para la clamidiosis aviar y la otra para la clamidiosis de rumiantes.

Un país europeo presentó una candidatura para laboratorio de referencia para la fiebre Q, que quedó pendiente de examen en espera de recibir más información sobre las actividades internacionales y de investigación, así como la lista completa de publicaciones recientes. Otro país europeo presentó una candidatura a laboratorio de referencia para la fiebre aftosa, de un establecimiento famoso en todo el mundo por su competencia y pericia, pero cuyo expediente no demostraba actividades internacionales suficientes, ni que los expertos consultasen específicamente sobre la fiebre aftosa, sino que detallaba otras enfermedades importantes. La Comisión solicitó a los candidatos que facilitasen informaciones adicionales y centrasen el expediente de candidatura sobre sus actividades en lo relativo a la fiebre aftosa.

Por último, se aplazó el examen de la candidatura de un país asiático para laboratorio de referencia para la piroplasmosis equina ya que el laboratorio candidato está actualmente ultimando un proyecto de hermanamiento de la OIE y la Comisión decidió posponer su decisión hasta la recepción del informe final sobre este proyecto.

## **2.2 Cambios de expertos en la lista de Laboratorios de Referencia**

El Consejo de la OIE presentará un proyecto de resolución el próximo mes de mayo para formalizar el papel del Delegado de la OIE en el procedimiento de reemplazo de expertos en los laboratorios de referencia de la OIE y, además, simplificará el procedimiento (cf. presentación introductoria del Dr. Miyagishima).

Los delegados de los países interesados han comunicado a la OIE las siguientes propuestas de cambios de expertos en los laboratorios de referencia de la OIE. La Comisión recomendó que fuesen aprobadas:

### *Peste equina*

La Dra. Montserrat Agüero reemplazará a la Dra. Concepción Gómez-Tejedor en el Laboratorio Central de Veterinaria, Algete (Madrid), ESPAÑA.

### *Influenza aviar*

El Dr. Frank Wong reemplazará al Dr. Paul Selleck en el Australian Animal Health Laboratory, Geelong, AUSTRALIA.

### *Influenza aviar y enfermedad de Newcastle*

La Dra. Mia Torchetti reemplazará a la Dra. Janice Pedersen en el National Veterinary Services Laboratories, Ames, ESTADOS UNIDOS AMERICA.

### *Peste porcina clásica*

El Dr. Paul Becher reemplazará al Prof. Volker Moennig en la universidad de Medicina Veterinaria de Hannover, ALEMANIA.

### *Gripe equina y rinoneumonitis equina*

El Dr. Armando Daminai reemplazará a la Dra. Kerstin Borchers en la universidad Libre de Berlín, ALEMANIA.

### *Fiebre aftosa*

El Dr. Somjai Kamolsiripichaiporn reemplazará al Dr. Wilai Linchongsubongkoch en el Instituto Nacional de Sanidad Animal, Pakchong, TAILANDIA.

### *Enfermedad de Newcastle*

El Dr. Sam McCullough reemplazará al Dr. Paul Selleck en el Australian Animal Health Laboratory, Geelong, AUSTRALIA.

### *Rabia*

El Dr. Richard Franka reemplazará al Dr. Charles Rupprecht en CDC (Centers for Disease Control and Prevention), Atlanta, Georgia, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA.

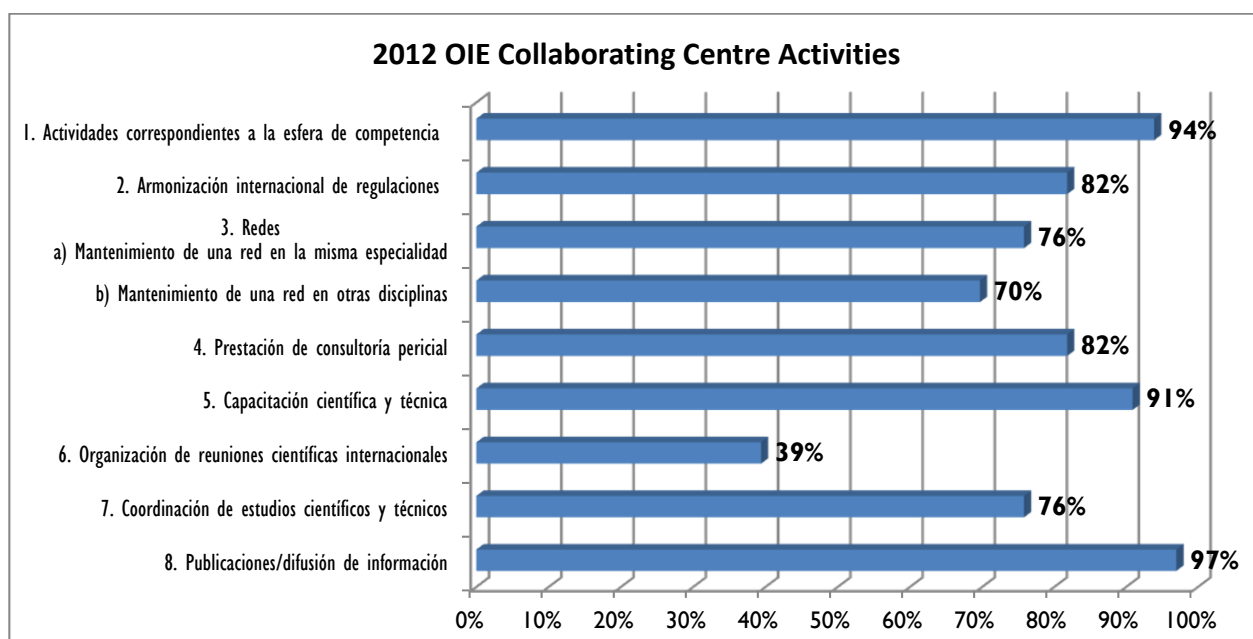
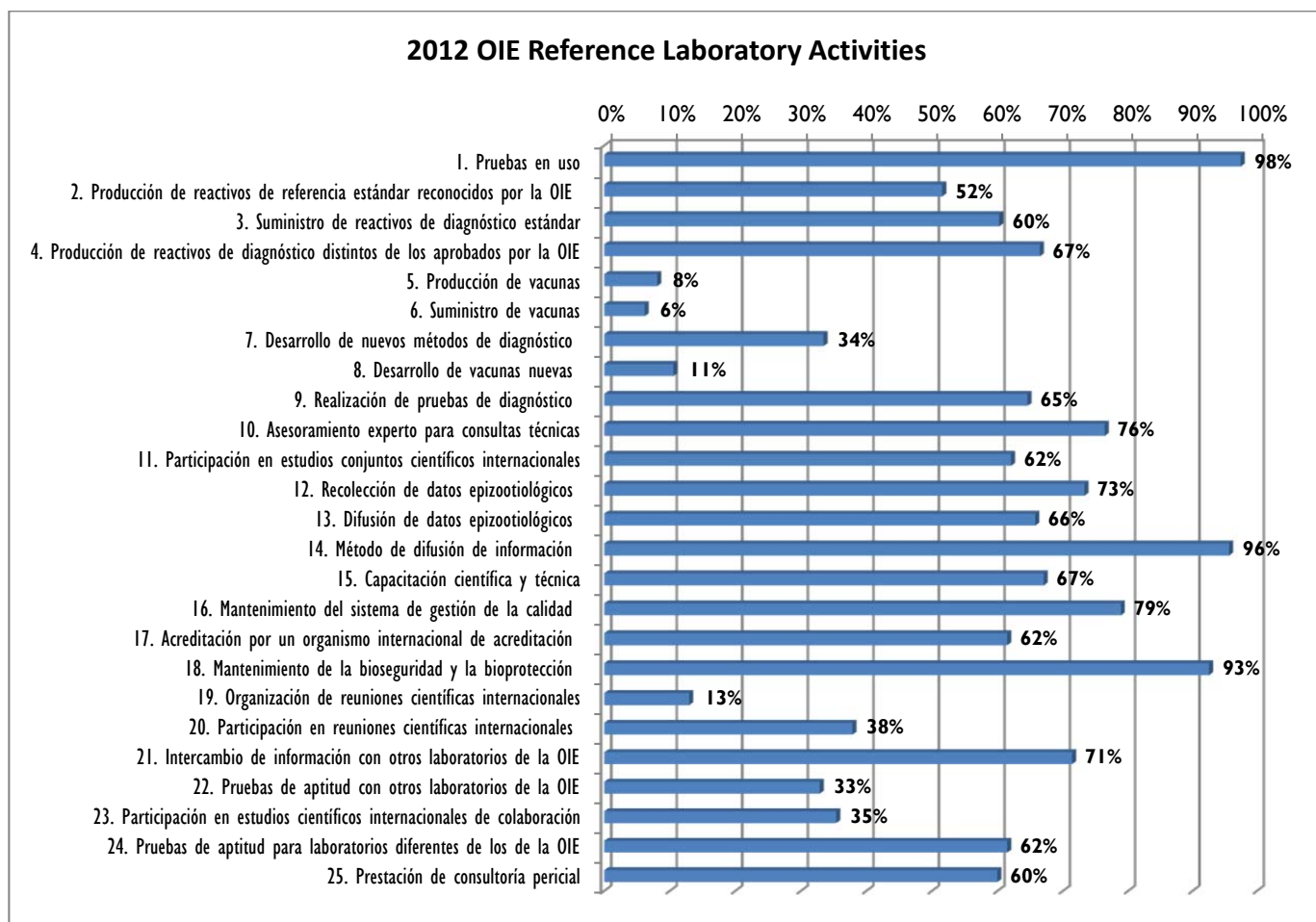
### *Fiebre del Nilo occidental*

La Dra. Federica Monaco reemplazará a la Dra. Rossella Lelli en el IZS dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", ITALIA.

## **2.3. Informes anuales de actividades de los centros de referencia en 2012**

Doña Min-Kyung Park, becaria del departamento Científico y Técnico de la OIE, se incorporó a la reunión. Recordó primero a la Comisión que los laboratorios de referencia habían empleado por primera vez un nuevo modelo de informe anual. Aunque la mayoría de los expertos había acogido con beneplácito el nuevo formato, también habían sido recibidas algunas críticas constructivas. La Sra. Park presentó un análisis de las actividades, junto con algunas propuestas de mejora para el modelo. El modelo revisado será enviado a los miembros de la Comisión para que lo comenten.

La Comisión expresó su agrado ante el apoyo entusiasta y los expertos consejos que los centros de referencia prestan a la OIE. Para mejorar más la comunicación y la colaboración entre la Comisión y la red, se convino en que los laboratorios de referencia recibirían los comentarios sobre sus actividades. Estos podrían incluirse en la carta que anunciará la próxima conferencia de los centros de referencia de la OIE (cf. punto 7.2). Las actividades internacionales relevantes para el trabajo de la OIE se resumen en los gráficos siguientes:



Para los informes de 2012, se utilizó como modelo un documento Office, en lugar de una webaminta. Para los informes de 2013, seguramente se dispondrá de una versión electrónica del modelo.

## **2.4. Reconocimiento mutuo de los centros de referencia de la OIE y la FAO**

La OIE y la FAO han firmado un acuerdo de reconocimiento mutuo de sus respectivos centros de referencia. En el inmediato futuro, se añadirá una mención en la lista de Centros de Referencia de la OIE publicada en su ciber sitio para identificar a los centros que están adscritos tanto a la OIE como a la FAO (cf. supra introducción del Dr. Miyagishima).

## **2.5. Examen de las candidaturas nuevas y pendientes para hermanamiento de laboratorios**

El Dr. Gounalan Pavade, del departamento Científico y Técnico de la OIE, informó sobre el programa de hermanamiento de laboratorios de la OIE. A 20 de febrero de 2013, han sido completados ocho proyectos, treinta y dos están en marcha y han sido aprobados diez que estaban a punto de empezar.

El Dr. Pavade presentó un modelo de certificado de finalización de hermanamiento que será entregado a los representantes de los establecimientos tutores y candidatos, en la Sesión General de la OIE, como reconocimiento de sus esfuerzos y logros.

Para cuatro propuestas de hermanamiento se solicitó la contribución técnica de la Comisión. Esta respaldó el contenido técnico de dos de ellos: el de Canadá-Perú para la rabia y las encefalopatías espongiformes transmisibles, y el de Canadá-Cuba para la encefalopatía espongiforme bovina.

Excepcionalmente, la Comisión solicitó que se le comunicasen cartas de apoyo para los otros dos proyectos: el de Reino Unido-Tanzania para la peste de los pequeños rumiantes, y el de Suecia-Uganda para la peste porcina africana y la fiebre aftosa, antes de que los miembros procedieran a aportar su contribución técnica. Por lo tanto, estas dos propuestas no recibieron la contribución técnica de la Comisión. La OIE aclarará los procedimientos de examen y aprobación de los proyectos de hermanamiento con la Comisión en fecha ulterior.

## **3. Grupos *ad hoc***

### **■ Reuniones anteriores de los grupos *ad hoc***

#### **3.1. Informe de la reunión del Grupo *ad hoc* sobre la fiebre del valle del Rift, 9–11 de octubre de 2012**

El Dr. François Diaz, del departamento Científico y Técnico de la OIE, presentó el informe de la reunión de este grupo. La Comisión observó que el Grupo proponía cambios en las categorías (es decir, la finalidad misma) en la tabla 1, *Métodos de prueba disponibles y finalidad*. Como está previsto añadir esta tabla a todos los capítulos sobre enfermedades, en lugar de las pruebas prescritas y de sustitución (cf. punto 4.2), la Comisión no aceptó esta modificación y le pidió al redactor-consultor que corrigiese la tabla para que correspondiera a los otros capítulos. La Comisión aprobó el informe, que figura en el [Anexo 3](#) al presente informe. Se ruega a los Países Miembros que comenten el capítulo actualizado del *Manual Terrestre* que figura en dicho anexo.

#### **3.2. Informe de la reunión del Grupo *ad hoc* de reflexión sobre nuevos enfoques del diagnóstico: Genómica aplicada, 10–12 de diciembre de 2012**

El Prof. Vincenzo Caporale presentó el informe de este grupo de reflexión y el libro blanco: *Secuenciación de alto rendimiento en la biología de infecciones veterinarias y los diagnósticos*. Una de las recomendaciones del informe era que la OIE formase un grupo *ad hoc* sobre la secuenciación de alto rendimiento, la bioinformática y la genómica computacional (HTS-BCG por sus siglas en inglés). Este tema se añadió al plan de trabajo de la Comisión (cf. punto 10.1). La Comisión aprobó el informe, que figura en el [Anexo 4](#) al presente informe.

#### **3.3. Informe de la reunión del Grupo *ad hoc* sobre validación de las pruebas de diagnóstico para animales salvajes, 15–17 de enero de 2013**

El Dr. Diaz presentó el informe de la reunión de este grupo. La Comisión aprobó el informe, que figura en el [Anexo 5](#) al presente informe. Se ruega a los Países Miembros que comenten el anexo adjunto: *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas para animales salvajes*. Una vez aprobado, dicho anexo será integrado al capítulo del *Manual Terrestre* relativo a los principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico para enfermedades infecciosas (cf. punto 5.1).

### **3.4. Informe de la reunión del Grupo *ad hoc* sobre peste porcina clásica, 4–6 de septiembre de 2012**

La Comisión estudió el informe de la reunión de este grupo y tomó nota de la recomendación de plantear el examen de la sección A revisada del capítulo del *Manual Terrestre* relativo a la peste porcina clásica, a fin de aumentar la introducción a los diferentes aspectos de la enfermedad y su control, pero la Comisión comentó que el propósito del *Manual Terrestre* son las normas para las pruebas de diagnóstico y las vacunas y que los demás aspectos de la enfermedad deben tratarse en otro lugar. La Comisión aprobó el informe, que figura en el Anexo 6 al presente informe. Se ruega a los Países Miembros que comenten la sección actualizada sobre vacunas del *Manual Terrestre* (texto adjunto).

### **Futuras reuniones de los grupos *ad hoc*: fechas y términos de referencia**

#### **3.5. Grupo *ad hoc* encargado de actualizar el capítulo 1.1.6: Principios de producción de vacunas veterinarias, y de redactar dos capítulos nuevos: 1.1.8, Requisitos mínimos para las instalaciones de producción de vacunas, y 1.1.9, Control de calidad de las vacunas**

El Centro Colaborador de la OIE para los productos médicos veterinarios de Fougères, Francia, se había ofrecido a actualizar el capítulo 1.1.6 y redactar dos nuevos capítulos, el 1.1.8 y el 1.1.9. La Comisión aceptó y pidió que el Centro se ponga en contacto con otros centros colaboradores de la OIE que se ocupen de la producción y evaluación de vacunas, a fin de elaborar documentos consensuados. Los textos que se reciban serán estudiados para determinar si deben ser enviados directamente a los Países Miembros para que los comenten o si pueden ser utilizados como punto de partida para el trabajo de un grupo *ad hoc*.

#### **3.6. Otros grupos *ad hoc* identificados durante esta reunión**

Los siguientes grupos *ad hoc* fueron identificados y añadidos al plan de trabajo de la Comisión (punto 10.1):

- Secuenciación de alto rendimiento, bioinformática y genómica computacional (HTS-BCG) (punto 3.2)
- Bioseguridad y bioprotección en los laboratorios veterinarios (punto 5.1)
- Agilizar el proceso de registro cuando simplemente se actualizan e incorporan cepas relevantes a las vacunas contra la gripe equina (punto 9.1).

## **4. Normalización y armonización internacionales**

### **■ Pruebas de diagnóstico**

#### **4.1. Registro de pruebas de diagnóstico de la OIE – examen de solicitudes**

El Dr. François Diaz, del departamento Científico y Técnico de la OIE, informó a la Comisión sobre las etapas en que se encontraban a la sazón los expedientes presentados conforme al Procedimiento de la OIE para el Registro de Kits de Diagnóstico.

Según dicho procedimiento, se debe renovar cada cinco años la inscripción de cada kit que figure en el Registro de la OIE. El Dr. Diaz informó a la Comisión que se estaba acercando el plazo de renovación para un kit de diagnóstico (Bio-Rad TeSeE<sup>TM</sup> Western Blot), que figuraba en el registro desde 2009. El proceso de renovación es responsabilidad de la Comisión. En virtud del protocolo, se ha preguntado al fabricante si deseaba mantener la misma finalidad para la que el kit ha sido certificado como válido, o si deseaba añadir finalidades nuevas. Los expertos de la OIE para las enfermedades a las que se destina el kit habían sido también contactados y se les había preguntado qué opinaban de la necesidad de proceder a una nueva evaluación de las finalidades para las que el kit ha sido certificado como válido. Basándose en esta información, la Comisión decidió solicitar al fabricante del kit que comunicase algunos datos adicionales, y tomar una decisión en su próxima reunión, en septiembre.

## 4.2. Pruebas prescritas y de sustitución

En septiembre de 2011, una de las propuestas de la reunión<sup>3</sup> de reflexión sobre la modernización del *Manual Terrestre* de la OIE consistió en incluir una tabla en los capítulos relativos a enfermedades en la que se enumerarían los métodos de diagnóstico disponibles para cada enfermedad, mencionando la finalidad para la que hubiera sido validada la prueba. Una tabla similar se publica ya en el *Manual de Pruebas de Diagnóstico para Animales Acuáticos*. Cada capítulo que ha sido actualizado desde que se aprobó esta propuesta incluye la tabla en cuestión. La aprobación del primero de ellos será propuesta en mayo de 2013. Las finalidades que se enumeran en la tabla son las que se enumeran en el capítulo sobre principios de validación, a saber:

- Finalidad
  - Población libre de infección
  - Animal individualmente libre de infección
  - Eficiencia de las políticas de erradicación
  - Confirmación de casos clínicos
  - Prevalencia de la infección – vigilancia
  - Condición inmune de animales individuales o de poblaciones post-vacunación

Dado que la tabla refleja mejor las finalidades y prácticas de las pruebas, podría reemplazar la lista actual de pruebas prescritas y de sustitución que figura tanto en el *Manual Terrestre* como en el *Código Terrestre*. Para empezar, se podría suprimir la columna de pruebas de sustitución. Para los capítulos sobre enfermedades, en el *Manual Terrestre*, en los que figura una tabla de métodos de prueba disponibles con su finalidad, se añadiría una referencia al capítulo, a la lista de pruebas prescritas (en algunos casos, reemplazaría a la/s prueba/s prescrita/s). Al final, en todos los capítulos figuraría dicha tabla y entonces se podría suprimir la lista de pruebas prescritas, de modo que puedan consultar los capítulos del *Manual Terrestre* quienes deseen saber cuáles son las pruebas disponibles y su aptitud para la finalidad para la que han sido validadas. El Prof. Caporale hará hincapié en esta propuesta con ocasión de su presentación ante la Asamblea en la Sesión General de mayo.

La Comisión comentó un texto que explica cómo se puede aprobar una prueba para que sea incluida en el *Manual Terrestre*. El texto enmendado será publicado en el ciber sitio.

## 4.3. La prueba PCR para la metritis contagiosa equina

La pregunta de un País Miembro sobre la prueba PCR (reacción de la polimerasa en cadena) para la metritis contagiosa equina había sido remitida a los expertos de la OIE, quienes consideraron que dicha prueba podría ser incluida, a su debido tiempo, en el capítulo del *Manual Terrestre*, como prueba adecuada para la circulación de animales, pero no estaban seguros de que los datos de validación fuesen suficientes.

## 5. Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres

Para tratar este punto del temario, se incorporó a la reunión de la Comisión el redactor consultor del *Manual Terrestre*, el Prof. Steven Edwards.

### 5.1. Decisión sobre las propuestas del Grupo de la Mesa Ampliada

La Comisión aprobó las propuestas del Grupo de la Mesa Ampliada, que se había reunido los días 18 y 19 de febrero de 2013 (cf. [Anexo 7](#)).

La Comisión estudió el documento final de la reunión del Grupo. Veintiún capítulos fueron aprobados con miras a su difusión entre los Países Miembros, en calidad de otras tantas versiones finales cuya aprobación sería propuesta a la aprobación en mayo del presente año. Uno de los capítulos debía ser revisado más en detalle y el capítulo, y la directriz, sobre gestión del riesgo biológico habían sido objeto de numerosos comentarios que serían tratados por un grupo *ad hoc* específico.

---

<sup>3</sup> Reunión de reflexión sobre la modernización del *Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para Animales Terrestres* de la OIE, celebrada en la sede de la OIE los días 12 y 13 de septiembre de 2011. El informe figura en el Anexo V al informe de la reunión de la Comisión de Normas Biológicas de la OIE, 14 a 16 de septiembre de 2011.



Los capítulos cuya aprobación sería propuesta en mayo de 2014, junto con los que serían propuestos en mayo de 2013, pero que habían llegado demasiado tarde para la primera difusión, o no habían sido recibidos todavía, serán revisados en la reunión de septiembre.

## **5.2. Decisión sobre la publicación de la Norma y Directrices de Calidad de la OIE para los laboratorios veterinarios: enfermedades infecciosas**

La Comisión reiteró que resultaba oportuno dejar de publicar el manual en su formato actual. La norma de calidad ha sido redactada en una época en la que los laboratorios de diagnóstico veterinario necesitaban ser orientados, puesto que muchos de ellos no estaban acreditados, situación que ha dejado de ser el caso. El grueso de la información que recoge el manual se puede encontrar ahora en el *Manual Terrestre*. La Comisión preguntó cómo se justificaba continuar este trabajo y pidió orientación para actualizar la publicación.

## **6. Proyectos de resolución para la Sesión General**

### **6.1. Resoluciones que serán propuestas en mayo de 2013**

A partir de mayo de 2013, el presidente de la Comisión seguirá presentando una resolución sobre textos nuevos o revisados para el *Manual Terrestre*, y una sobre el registro de pruebas de diagnóstico validadas y certificadas por la OIE. Sin embargo, como la responsabilidad de examinar las candidaturas a centro colaborador también corre ahora a cargo de las cuatro comisiones especializadas, el Consejo de la OIE será quien presente las resoluciones sobre la designación y retirada de centros de referencia. Este año, también se propondrá una resolución para formalizar el procedimiento de reemplazo de expertos en los laboratorios de referencia de la OIE (cf. introducción del Dr. Miyagishima).

## **7. Conferencias, talleres y reuniones**

### **7.1. Información sobre el seminario de 1 día de la OIE, 7 de junio de 2013 (tema: Nuevos enfoques al diagnóstico: genómica aplicada) que se celebrará durante WAVLD<sup>4</sup>, 5–8 de junio de 2013, Berlín, Alemania**

La Comisión ratificó el programa y la lista de ponentes para este seminario de 1 día.

### **7.2. Conferencia internacional de los centros de referencia de la OIE, Seúl, Corea, 2014**

La Comisión tomó nota de que la tercera conferencia internacional de los centros de referencia de la OIE tendría lugar en Seúl, Corea, del 7 al 9 de octubre de 2014. Los miembros de la Comisión convinieron en finalizar el temario de la conferencia en su próxima reunión: en septiembre de 2013.

## **8. Relaciones con las otras Comisiones**

### **8.1. Comisión Científica para las Enfermedades de los Animales (Comisión Científica)**

*Asuntos remitidos por la Comisión Científica a la Comisión de Normas Biológicas*

La Comisión Científica preguntó si existía una prueba para el diagnóstico del muermo que permitiría a la OIE añadir esta enfermedad a la lista de enfermedades para las que existe un procedimiento de reconocimiento oficial del estatus zoonosario de un País Miembro. La Comisión remitió a la Comisión Científica al capítulo actualizado cuya aprobación será propuesta en mayo de 2013 y, en particular, a la tabla que incluye los métodos de prueba disponibles y las finalidades para las que han sido validados.

La Comisión remitió a los laboratorios de referencia de la OIE la solicitud relativa a un método de PCR validado y aceptado internacionalmente para la peste equina.

Asimismo, la Comisión remitió a los laboratorios de referencia de la OIE la solicitud de información nueva sobre la prueba por interferón gamma para la tuberculosis bovina. Tomó nota de que un grupo *ad hoc* sobre la tuberculosis bovina se iba a reunir en abril de 2013.

---

<sup>4</sup> WAVLD: Asociación Mundial de Especialistas de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario

La Comisión tomó nota de que una nueva generación de vacuna contra la peste porcina clásica con marcador vivo sería registrada en breve en la Unión Europea.

Por último, la Comisión tomó nota de que se iba a reunir un grupo *ad hoc* sobre la fiebre del valle del Rift para estudiar el capítulo del *Código Terrestre*.

La Comisión solicitó un procedimiento formal para las reuniones conjuntas de los grupos *ad hoc*, a saber, que cuando un grupo se reúna para deliberar sobre un capítulo del *Código Terrestre*, pero exista un capítulo del *Manual Terrestre* que será afectado también, la Comisión de Normas Biológicas debería ser informada en la fase de planificación, de tal modo que el punto del temario pueda ser preparar y previsto en colaboración con la Comisión.

## **8.2. Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Terrestres (Comisión del Código)**

*Asuntos remitidos por la Comisión del Código a la Comisión de Normas Biológicas*

Un País Miembro había cuestionado la necesidad de detalles sobre las pruebas de diagnóstico en el capítulo del *Código Terrestre* sobre zoonosis transmisibles de primates no humanos. Se pidió a la Comisión del Código que suprimiese el texto en cuestión y lo trasladase a la Comisión de Normas Biológicas, que, a su vez, le pediría al redactor consultor que lo integre, en su caso, al capítulo del *Manual Terrestre*.

La Comisión remitió a los laboratorios de referencia de la OIE la solicitud de opinión sobre la supresión de la paratuberculosis de la lista.

## **9. Información de interés**

### **9.1. Panel de Expertos en Vigilancia: conclusiones y recomendaciones sobre la composición de las vacunas contra la gripe equina (4 de marzo de 2013)**

El informe de la reunión del Panel de Expertos en Vigilancia (PEV) sobre la composición de la vacuna contra la gripe equina, que se celebró el 4 de marzo de 2013 y figura en el Anexo 8 al presente informe, fue enviado a la sede de la OIE después de la reunión de la Comisión. Las principales conclusiones de la reunión del PEV eran las siguientes:

Las vacunas destinadas al mercado internacional deben contener tanto el clado 1 como el clado 2 de los virus de la subcepa Florida.

El clado 1 está representado por los virus afines a A/eq/South Africa/04/2003 o afines a A/eq/Ohio/2003.

El clado 2 está representado por los virus afines a A/eq/Richmond/1/2007.

La Comisión resaltó la importancia del informe del PEV y la necesidad de que sea distribuido ampliamente. Será publicado en el *Boletín* de la OIE.

Respondiendo a una pregunta planteada en la Sesión General de mayo de 2012, sobre la posibilidad de acortar el proceso de registro de vacunas cuando simplemente se trata de actualizar e incorporar las cepas pertinentes en las vacunas contra la gripe equina, la Comisión aclaró que añadiría a su plan de trabajo un grupo *ad hoc* sobre esta cuestión, compuesto por representantes de la industria, de las agencias reguladoras y del PEV sobre la composición de las vacunas contra la gripe equina.

### **9.2. Actualización sobre OFFLU**

El Dr. Peter Daniels informó a la Comisión sobre OFFLU – la red conjunta de la OIE y la FAO de expertos en gripe animal. OFFLU celebró dos reuniones del Comité Ejecutivo para estudiar y coordinar los progresos sobre diez actividades técnicas. Una de las actividades técnicas que se desarrolla en el Instituto Friedrich-Loeffler, Alemania, (laboratorio de referencia de la OIE para la influenza aviar) alcanzó su objetivo desarrollando un ARN empleable universalmente para los ensayos por PCR específicos para el virus H5 de la influenza aviar. En septiembre de 2012, se celebró la reunión de la OMS<sup>5</sup> sobre la composición de vacunas en el hemisferio norte, en Pequín, China (Rep. Pop.). La red OFFLU contribuyó con 118 secuencias de H5 y 17 secuencias de H9 para ayudar a la preparación de la OMS para las pandemias. El artículo sobre “Estudio de los virus A de gripe en los porcinos del mundo”, del grupo de OFFLU sobre gripe porcina, fue aceptado para ser publicado en el periódico *Zoonoses and Public Health*.

---

<sup>5</sup> OMS: Organización Mundial de la Salud

Va a ser publicado un editorial sobre la agenda de investigación de OFFLU en *Influenza and Other Respiratory Viruses*. OFFLU elaboró un documento en el que detalla los términos de referencia de los distintos comités y su lugar en el seno de su estructura. El boletín anual de OFFLU de 2012, en el que se recopilan los logros del año, ha sido preparado.

### **9.3. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente – el mercurio en las vacunas**

La Comisión tomó nota del documento final del comité de negociación intergubernamental del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente sobre la preparación de un instrumento mundial jurídicamente vinculante sobre el mercurio. El texto del convenio, una vez aprobado, permitirá que se siga empleando tiomersal en las vacunas, ya que las “vacunas que contienen tiomersal como conservante” estarán excluidas específicamente de la lista de productos prohibidos. Además, para que esté más claro, hay una nota a pie de página sobre la categoría prohibida de “biocidas” que explica que “los conservantes en los productos farmacéuticos o las vacunas” no se incluyen en esta categoría. Era importante puesto que no existen alternativas actualmente al uso de tiomersal para la conservación y producción de vacunas veterinarias, en particular para el ganado, que suelen ser preparados multidosis.

La lista de exclusiones podría ser revisada en el futuro, pero no antes de que hayan transcurrido cinco años desde la entrada en vigor del convenio.

### **9.4. Manual de la OIE para misiones PVS en laboratorios**

Como consecuencia de la última reunión, se pidió a la Comisión que diese su opinión sobre el manual de la OIE para misiones PVS en laboratorios, que todavía está siendo elaborado. Los miembros de la comisión convinieron en enviar sus comentarios a la Dra. Beverly Schmitt, quien aceptó enviar una recapitulación de todos ellos a la sede de la OIE. La Comisión subrayó que sería lógico que hubiese una interacción entre el componente de laboratorios de la herramienta de evaluación PVS, por una parte, y, por otra, la Comisión de Laboratorios, y reiteró estar dispuesta a apoyar esta iniciativa (cf. punto 10.1).

### **9.5. 3ª Conferencia sobre la próxima generación de secuenciado**

La Comisión tomó nota del anuncio de esta conferencia.

## **10. Otros asuntos**

### **10.1. Programa de trabajo y actividades (a partir de febrero de 2013)**

En la última reunión, el Prof. Caporale había invitado a todos los miembros de la Comisión a que acudiesen a esta reunión con sus propuestas para el programa de actividades para los años 2013 a 2015. Así, el plan de trabajo podría ser establecido.

La Comisión consideró que el servicio que presta a la OIE podría abarcar más que el examen de las candidaturas a centro de referencia, y la actualización del *Manual Terrestre*. Al cabo de un largo debate, la Comisión identificó tres áreas sobre las que propone focalizarse, a saber:

- Evaluar las actividades encomendadas a los laboratorios de referencia de la OIE: la OIE desea contar con una red mundial de laboratorios que suministren resultados de pruebas coherentes. Para alcanzar esta meta, necesitaría supervisar más de cerca las actividades de los laboratorios de referencia mediante, por ejemplo, el desarrollo de criterios de desempeño seguido por una auditoría de los laboratorios para determinar su vigor científico. Se podría adaptar un procedimiento similar al que aplica la Organización Mundial de la Salud para supervisar sus laboratorios para la gripe.
- PVS para laboratorios: la Comisión cree firmemente que las misiones PVS deberían incluir un componente para laboratorios y que, en particular, debería intervenir en la evaluación de la gestión de la calidad de los sistemas de laboratorio. Aparte de desarrollar un sistema para armonizar las actividades de los laboratorios destinado a obtener resultados de diagnóstico estándar mundiales, se deberá facilitar material de capacitación a los expertos que efectúen las misiones PVS. La Comisión también podría implicarse en ese proceso de desarrollo.

- Coordinar las interacciones entre los puntos focales para los laboratorios y los laboratorios de referencia de la OIE: la OIE ha organizado seminarios piloto de capacitación para los puntos focales sobre las cuestiones relativas a los laboratorios, en dos regiones. Hasta la fecha, las actividades de los Puntos Focales no son dirigidas por ninguna comisión especializada o grupo de trabajo de la OIE, sino que “utilizan” a expertos de los laboratorios de referencia y los centros colaboradores de la OIE. Los puntos focales para laboratorios, si se extienden a todas las regiones, deberán interactuar con los expertos de los laboratorios de referencia de la OIE. La Comisión desea estar implicada en las actividades futuras y ayudar a coordinar estas relaciones.

La Comisión subrayó estar dispuesta a respaldar la labor de la OIE en estas tres áreas, y en cualquier otra área que identifique la sede de la OIE.

El plan de trabajo actual figura en el Anexo 9.

## **10.2. Fecha de la próxima reunión de la Comisión de Normas Biológicas**

La Comisión tomó nota de las fechas de su próxima reunión: 10-12 de septiembre de 2013.

## **11. Aprobación del informe**

La Comisión aprobó el informe.

---

.../Anexos

## REUNIÓN DE LA COMISIÓN DE NORMAS BIOLÓGICAS DE LA OIE

París, 20–22 de febrero de 2013

---

### Temario

#### 1. Aprobación del temario

#### 2. Centros de Referencia de la OIE

- 2.1. Candidaturas para la designación como Centro de Referencia de la OIE
- 2.2. Cambios de expertos en la lista de Laboratorios de Referencia
- 2.3. Informes anuales de actividades de los Centros de Referencia en 2012
- 2.4. Reconocimiento mutuo de los centros de referencia de la OIE y la FAO
- 2.5. Solicitudes nuevas y pendientes para el hermanamiento de laboratorios

#### 3. Grupos *ad hoc*

##### Reuniones pasadas de los grupos *ad hoc*: informes para aprobación

- 3.1. Informe de la reunión del Grupo *ad hoc* sobre la fiebre del valle del Rift, 9-11 de octubre de 2012
- 3.2. Informe de la reunión del Grupo *ad hoc* de intercambio de ideas sobre nuevos enfoques aplicables al diagnóstico: genómica aplicada, 10–12 de diciembre de 2012
- 3.2. Informe de la reunión del Grupo *ad hoc* de reflexión sobre nuevos enfoques del diagnóstico: Genómica aplicada, 10–12 de diciembre de 2012
- 3.3. Informe de la reunión del Grupo *ad hoc* sobre validación de las pruebas de diagnóstico para animales salvajes, 15–17 de enero de 2013

##### Reuniones planeadas de los Grupos *ad hoc*

- 3.5. Grupo *ad hoc* encargado de actualizar el capítulo 1.1.6: Principios de producción de vacunas veterinarias, y de redactar dos capítulos nuevos: 1.1.8, Requisitos mínimos para las instalaciones de producción de vacunas, y 1.1.9, Control de calidad de las vacunas
- 3.6. Otros grupos *ad hoc* identificados durante esta reunión

#### 4. Normalización y armonización internacionales

##### • Pruebas de diagnóstico

- 4.1. Registro de pruebas de diagnóstico de la OIE – examen de solicitudes
- 4.2. Pruebas prescritas y pruebas de sustitución
- 4.3. La prueba PCR para la metritis contagiosa equina

#### 5. Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres

- 5.1. Decisión sobre las propuestas del Grupo de la Mesa Ampliada
- 5.2. Decisión sobre la publicación de la Norma y Directrices de Calidad de la OIE para los laboratorios veterinarios: enfermedades infecciosas

#### 6. Proyectos de resolución para la Sesión General

- 6.1. Resoluciones que se propondrán en mayo de 2013

## **7. Conferencias, talleres y reuniones**

- 7.1. Información sobre el seminario de 1 día de la OIE, 7 de junio de 2013 (tema: Nuevos enfoques al diagnóstico: genómica aplicada) que se celebrará durante WAVLD, 5–8 de junio de 2013, Berlín, Alemania
- 7.2. Conferencia internacional de los centros de referencia de la OIE, Seúl, Corea, 2014

## **8. Relaciones con las otras Comisiones**

- 8.1. Comisión Científica para las Enfermedades de los Animales
- 8.2. Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Terrestres

## **9. Información de interés**

- 9.1. Panel de expertos en vigilancia de la composición de las vacunas contra la gripe equina – conclusiones y recomendaciones (4 de marzo de 2013)
- 9.2. Actualización sobre OFFLU
- 9.3. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente – el mercurio en las vacunas
- 9.4. Manual de la OIE para misiones PVS en laboratorios
- 9.5. 3ª Conferencia sobre la próxima generación de secuenciado

## **10. Otros asuntos**

- 10.1. Programa de trabajo y actividades
- 10.2. Fecha de la próxima reunión de la Comisión de Normas Biológicas: 10–12 de septiembre de 2013

## **11. Aprobación del informe**

---

## REUNIÓN DE LA COMISIÓN DE NORMAS BIOLÓGICAS DE LA OIE

París, 20–22 de febrero de 2013

## Lista de participantes

## MIEMBROS

**Prof. Vincenzo Caporale***(Presidente)*

Colleaterrato Alto

64100 Teramo

ITALIA

Tel: (+39-348) 79.78.711

(+39-0861) 210.900

[v.caporale@oie.int](mailto:v.caporale@oie.int)[caporalevincenzo@gmail.com](mailto:caporalevincenzo@gmail.com)**Dra. Beverly Schmitt***(Miembro)*

National Veterinary Services

Laboratories, Diagnostic Virology

Laboratory, P.O. Box 844, Ames,

IA 50010

ESTADOS UNIDOS

Tel.: (1-515) 337.75.32

Fax: (1-515) 337.73.48

[beverly.j.schmitt@aphis.usda.gov](mailto:beverly.j.schmitt@aphis.usda.gov)**Dr. Hualan Chen***(Vicepresidente)*

National Avian Influenza Reference

Laboratory, Animal Influenza Laboratory

of the Ministry of Agriculture, Harbin

Veterinary Research Institute, CAAS

427 Maduan Street, Harbin 150001

CHINA (REP. POP.)

Tel.: (86-451) 8593.5079

Fax: (86-451) 8273.3132

[hlchen1@yahoo.com](mailto:hlchen1@yahoo.com)**Dr. Paul Townsend***(Miembro)*

Animal Health and Veterinary

Laboratories Agency

New Haw, Addlestone

Surrey KT15 3NB

REINO UNIDO

Tel.: (44-1932) 341.111

Fax: (44-1932) 357.838

[paul.townsend@ahvla.defra.gsi.gov.uk](mailto:paul.townsend@ahvla.defra.gsi.gov.uk)**Dr. Rodolfo C. Rivero***(Vicepresidente)*

Coordinador nacional EET, Ministerio de

Ganadería, Agricultura y Pesca,

Dirección de Laboratorios Veterinarios

Director de Laboratorio Regional

"Miguel C. Rubino", C.C. 57037

C.P. 6000 Paysandú

URUGUAY

Tel (598) 72.25229 o 27871

Fax (598) 72.27614

[rivero@mgap.gub.uy](mailto:rivero@mgap.gub.uy)**Dr. Peter Daniels***(Miembro)*

Australian Animal Health Laboratory

PMB 24

Geelong 3220 X

AUSTRALIA

Tel: (61-3) 5227.5014

Fax: (61-3) 5227.5555

[peter.daniels@csiro.au](mailto:peter.daniels@csiro.au)REDACTOR CONSULTOR DEL *MANUAL TERRESTRE***Prof. Steven Edwards**

c/o OIE 12 rue de Prony

75017 Paris, FRANCIA

Tel.: (33-1) 44.15.18.88

Fax: (33-1) 42.67.09.87

[steve-oie@cabanas.waitrose.com](mailto:steve-oie@cabanas.waitrose.com)

## SEDE 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

[oie@oie.int](mailto:oie@oie.int)**Dr. Kazuaki Miyagishima**

Director general adjunto

Jefe del departamento Científico y

Técnico

[k.miyagishima@oie.int](mailto:k.miyagishima@oie.int)**Dra. Elisabeth Erlacher-Vindel**

Jefa adjunta del departamento Científico

y Técnico

[e.erlacher-vindel@oie.int](mailto:e.erlacher-vindel@oie.int)**D.<sup>a</sup> Sara Linnane**

Redactora científica, departamento

Científico y Técnico

[s.linnane@oie.int](mailto:s.linnane@oie.int)**Dr. François Diaz**

Comisionado, departamento Científico y

Técnico

[f.diaz@oie.int](mailto:f.diaz@oie.int)**Dr. Gounalan Pavade**

Coordinador OFFLU Coordinator,

departamento Científico y Técnico

[g.pavade@oie.int](mailto:g.pavade@oie.int)**D.<sup>a</sup> Min Kyung Park**

Becaria, departamento Científico y

Técnico

[m.park@oie.int](mailto:m.park@oie.int)





**INFORME DE LA REUNIÓN DEL GRUPO *AD HOC* DE LA OIE  
SOBRE LA FIEBRE DEL VALLE DEL RIFT  
París, 9–11 de octubre de 2012**

---

**1. Bienvenida**

El Grupo *ad hoc* de la OIE sobre la fiebre del valle del Rift se reunió del 9 al 11 de octubre de 2012 en la sede de la OIE, en París, Francia. El Dr. Kazuaki Miyagishima, Director General Adjunto y Jefe del Departamento Científico y Técnico de la OIE, dio la bienvenida a los participantes en nombre del Dr. Bernard Vallat, Director General de la OIE.

**2. Designación del presidente y del relator**

El Dr. Pierre Rollin y el Dr. Jeroen Kortekaas fueron nombrados presidente y relator respectivamente.

**3. Aprobación del temario**

El temario y la lista de participantes figuran, respectivamente, en los Anexos I y II.

**4. Finalización de la actualización del Capítulo 2.1.14. sobre la fiebre del valle del Rift del *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres***

El grupo examinó el capítulo a la luz de los últimos avances científicos y las técnicas más recientes disponibles para el desarrollo de pruebas de diagnóstico y vacunas teniendo en cuenta la versión actualizada de las instrucciones destinadas a los autores, aprobada por la Comisión de Normas Biológicas en 2012.

**a) Resumen y Sección A – Introducción**

Solo se aportaron cambios menores al texto: se añadió una frase a la introducción para facilitar información sobre los diagnósticos diferenciales.

**b) Sección B – Técnicas de diagnóstico**

De acuerdo con las instrucciones destinadas a los autores, el grupo añadió una tabla al principio de esta sección resumiendo los métodos de prueba disponibles y sus “finalidades”. El grupo fue el primer grupo *ad hoc* en aplicar esta instrucción. Durante el debate sobre la elaboración de la tabla, el grupo tuvo la sensación de que resultaba complicado dar forma de tabla a los métodos de prueba de la fiebre del valle del Rift (FVR) y a sus finalidades propuestas. Además, el grupo opinó que algunas de esas finalidades se superponían a otras y eran difíciles de aplicar a un modelo general. Por consiguiente, el grupo adaptó las finalidades propuestas para hacerlas más aplicables a la FVR, pero también para garantizar su aplicabilidad más amplia (a otras enfermedades) y evitar su superposición. Estas son las finalidades que se incluyeron en la tabla: vigilancia, confirmación en laboratorio de casos clínicos, estatus humoral inmune en animales individuales o en poblaciones tras la vacunación, y población libre de infección. También se añadieron algunas notas a pie de tabla para aportar más información cuando se consideró necesario. Sin embargo, la impresión del grupo fue que el formato en tabla tendía a simplificar las situaciones actuales y podría no resultar útil. Como alternativa, el grupo sugirió particularmente que se redactasen párrafos cortos describiendo las ventajas e inconvenientes de cada método de prueba de diagnóstico y aconsejando cómo aplicarlo en diferentes situaciones epidemiológicas.

A instancias de la Comisión de Normas Biológicas, el grupo incorporó, en su caso, protocolos detallados sobre los diversos métodos de prueba. El grupo acordó que esos protocolos deberían describir preferentemente el uso de pruebas de diagnóstico validadas por los Laboratorios de Referencia de la OIE para la FVR.

El grupo fue informado de que, en el *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas (Manual Terrestre)*, deben evitarse las referencias a los kits de diagnóstico comerciales. Al respecto, el grupo recalcó que los protocolos empleados por los Laboratorios de Referencia de la OIE se validaban mediante material obtenido comercialmente y que, por lo tanto, deberá usarse ese material cuando se sigan dichos protocolos.

El grupo también señaló que los métodos para las pruebas de diagnóstico recomendados en el capítulo deberán validarse en cada laboratorio que aplique esas técnicas en colaboración con los Laboratorios de Referencia de la OIE para la FVR. El grupo convino incluir una aclaración en este sentido en la introducción de la Sección B: '*Todos los métodos de pruebas descritos seguidamente deberán validarse en cada uno de los laboratorios que los utilicen*'. Además, se añadió una referencia al Capítulo 1.1.5. (Principios de validación para las pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas) del *Manual Terrestre*.

## c) Sección C – Requisitos para las vacunas

### 1. Contexto

Se añadió una tabla para describir brevemente las vacunas empleadas actualmente. Aparte de las vacunas veterinarias disponibles en el comercio (vacunas vivas basadas en la cepa atenuada Smithburn, vacunas inactivadas y vacuna Clon 13), se hizo constar asimismo la vacuna humana inactivada TSI-GSD-200, aunque ya no está disponible. El grupo pensó que esta información podría ser útil a los usuarios del *Manual Terrestre*.

### 2. Esquema de fabricación y requisitos mínimos para las vacunas convencionales

#### Punto 2a – Características del inóculo vírico

Aparte de modificaciones menores, se añadió aquí el subapartado iii), *Validación como cepa vacunal*. El subapartado iv), *Procedimiento de emergencia para la aceptación provisional de un nuevo virus de inóculo primario en el caso de epizootia*, no se incluyó porque no es aplicable al virus de la FVR, dado que solo existe un serotipo viral de esta enfermedad.

#### Punto 2b – Método de producción

Además de ligeras modificaciones, en el subapartado iii), *Control durante el proceso*, se añadió una frase pertinente de la Farmacopea Europea, que describe brevemente una prueba *in vitro* del procedimiento de inactivación.

En el subapartado iv), *Pruebas de lotes del producto final (inocuidad)*, se hizo figurar un pequeño protocolo para la prueba de inocuidad de los lotes.

#### Punto 2c – Requisitos para autorización/registro/licencia

El grupo creó texto para el subapartado i), *Proceso de producción*, y añadió más detalles al subapartado ii), *Requisitos de seguridad*, incluyendo protocolos para las pruebas de seguridad (tanto en animales jóvenes como en hembras embarazadas) e información sobre las precauciones que tomar tanto para las vacunas vivas como para las inactivadas. El grupo también introdujo un protocolo para la prueba de reversión a la virulencia e información sobre las consideraciones medioambientales para las vacunas vivas.

#### Punto 3 – Requisitos de eficacia

El grupo admitió que la demostración de la eficacia de la vacuna en los corderos probaría suficientemente la calidad de una vacuna como para validar su uso en otras especies, aunque sería más apropiado probar la eficacia de la vacuna en las especies a las que fuera a aplicarse la vacuna. La justificación de esta recomendación consiste, primero, en reducir el número de animales utilizados para experimentos y, segundo, en abordar el hecho de que, salvo para el ganado bovino, no existen protocolos para evaluar la eficacia de la vacuna en otras especies diana (cabras, especies de la fauna silvestre).

Se aportaron asimismo protocolos para valorar la inmunogenicidad de los corderos y las ovejas embarazadas y se especificó en el texto que deberían hacerse los debidos ajustes cuando se tratase de otras especies.

El grupo convino en que era importante determinar la carga viral de desafío en la sangre, tanto por reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa en tiempo real (qRT-PCR) como por aislamiento del virus. Al combinar ambos métodos, el análisis virémico en animales de control manifestará el éxito del desafío, así como la sensibilidad de los procedimientos de aislamiento del virus y de qRT-PCR.

**Punto 4 – Vacunas que permiten la estrategia DIVA (detección de infección en animales vacunados)**

El grupo señaló que no existía ninguna estrategia DIVA aplicable a las vacunas existentes contra la FVR.

**Punto 5 – Duración de la inmunidad**

El grupo elaboró un párrafo para este punto.

**Punto 6 – Estabilidad**

El grupo elaboró un párrafo para este punto.

**5. Aprobación del informe**

El grupo aprobó el informe al final de la reunión.

---

.../Anexos

Anexo I

**GRUPO AD HOC SOBRE LA FIEBRE DEL VALLE DEL RIFT**  
**París, 9–11 de octubre de 2012**

---

**Temario**

1. Bienvenida
  2. Designación del presidente y del relator
  3. Aprobación del temario
  4. Finalización de la actualización del Capítulo 2.1.14. sobre la fiebre del valle del Rift del *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres*
  5. Aprobación del informe
-

**GRUPO AD HOC SOBRE LA FIEBRE DEL VALLE DEL RIFT****París, 9–11 de octubre de 2012****Lista de participantes****MIEMBROS**

**Dr. Baratang Alison Lubisi**  
 Onderstepoort Veterinary Institute  
 Agricultura Research Council  
 Private Bag X05  
 Onderstepoort 0110  
 SUDÁFRICA  
 Tel.: +27-12 529 91 17  
 Fax: +27-12 529 94 18  
 lubisia@arc.agric.za

**Dr. Jeroen Kortekaas**  
 Project Leader, Central Veterinary Institute of  
 Wageningen, University Research  
 P. O. Box 65  
 NL-8200 AB Lelystad  
 PAÍSES BAJOS  
 Tel.: +31 320 238 198  
 Fax: +31 320 238 225  
 jeroen.kortekaas@wur.nl

**Dra. Michèle Bouloy**  
 Unité de génétique moléculaire des Bunyavirus  
 Département de Virologie  
 Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux  
 75724 Paris cedex 15  
 FRANCIA  
 Tel.: +33-1 40.61.31.57  
 Fax: +33-1 40.61.31.51  
 mbouloy@pasteur.fr

**Dr. Amadou Alpha Sall**  
 Institut Pasteur de Dakar  
 Unité des Arbovirus et Virus de fièvres  
 hémorragiques  
 36, Avenue Pasteur, BP 220  
 Dakar  
 SENEGAL  
 Tel.: +221.33.839.92.23  
 Fax: +221.33.839.92.10  
 asall@pasteur.sn

**Dr. Pierre Rollin**  
*(Presidente)*  
 Special Pathogens Branch  
 National Center for Zoonotic, Vector-borne,  
 and Enteric Diseases  
 Centers for Disease Control and Prevention  
 1600 Clifton Road, MS G-14  
 Atlanta, GA 30333  
 ESTADOS UNIDOS  
 Tel.: +404-639 1124  
 Fax: +404-639 1115  
 pyr3@cdc.gov

**Dr. Michel Lombard**  
 22 rue Crillon  
 69006 Lyon  
 FRANCIA  
 Tel.: +33 4 78 93 90 89  
 lombard.family@wanadoo.fr

**REPRESENTANTE DE LA COMISIÓN DE NORMAS BIOLÓGICAS DE LA OIE**

**Prof. Vincenzo Caporale**  
*(Invitado, pero no pudo asistir)*  
 President, Biological Standards Commission  
 Colleaterrato Alto  
 64100 Teramo  
 ITALIA  
 Tel.: +39 348 79 78 711  
 caporalevincenzo@gmail.com

**OBSERVADORES**

**Dr. Baptiste Dungu**  
*(Invitado, pero no pudo asistir)*  
 Senior Director: Research & Development  
 GALVmed (Global Alliance for Livestock  
 Veterinary Medicines)  
 Doherty Building, Pentlands Science Park  
 Bush Loan  
 Edinburgh EH26 0PZ  
 Scotland  
 REINO UNIDO  
 Tel.: +44 0131 445 6198  
 Fax: +44 0131 445 6222  
 Baptiste.Dungu@galvmed.org

**Dr. Stéphane de La Rocque**  
*(Invitado, pero no pudo asistir)*  
 Chargé de mission  
 Veterinary Public Health  
 World Health Organization  
 20 Ave Appia  
 1211 Geneva 27  
 SUIZA  
 delarocques@who.int

**Dr. Danny Goovaerts**  
 IFAH Representative  
 Director Global R&D Governmentally Regulated  
 Diseases  
 MSD Animal Health  
 Wim de Körverstraat 35  
 P.O. Box 31  
 5830 AA Boxtmeer  
 PAÍSES BAJOS  
 Tel.: + 31 (0) 485 587727  
 Fax: + 31 (0) 485 587339  
 Danny.Goovaerts@merck.com

**PERSONAL DE LA OIE**

**Dr. Bernard Vallat**  
 Director General  
 12 rue de Prony  
 75017 Paris  
 FRANCIA  
 Tel.: (33) 1 44 15 18 88  
 Fax: (33) 1 42 67 09 87  
 oie@oie.int

**Dr. Kazuaki Miyagishima**  
 Director General Adjunto,  
 Jefe del Departamento Científico y Técnico  
 k.miyagishima@oie.int

**Dr. François Diaz**  
 Departamento Científico y Técnico  
 f.diaz@oie.int

**Dra. Susanne Münstermann**  
 Departamento Científico y Técnico  
 s.munstermann@oie.int

1 Anexo III

## 2 CHAPTER 2.1.14.

## 3 RIFT VALLEY FEVER

## 4 SUMMARY

5 *Rift Valley fever (RVF) is a peracute or acute zoonotic disease of domestic ruminants in Africa. The*  
 6 *virus is currently confined to the African continent and Arabian Peninsula. It is caused by a single*  
 7 *serotype of a mosquito-borne bunyavirus of the Bunyaviridae family (genus Phlebovirus). The disease*  
 8 *occurs in climatic conditions favouring the breeding of mosquito vectors and is characterised by*  
 9 *abortion, neonatal mortality and liver damage. The disease is most severe in sheep, goats and cattle,*  
 10 *in which it produces abortions in pregnant animals and a high mortality rate in the newborn. Older non-*  
 11 *pregnant animals, although susceptible to infection, are more resistant to clinical disease. There is*  
 12 *considerable variation in the susceptibility to RVF of animals of different breeds/species. Those breeds*  
 13 *or strains that are exotic to Africa or are from areas where RVF is not endemic, tend to be more*  
 14 *susceptible. Camels usually suffer an inapparent infection with RVF virus (RVFV), but sudden*  
 15 *mortality, neonatal mortality and abortion occurs and abortion rates can be as high as in cattle. Among*  
 16 *ruminant game, buffalo also abort during an inapparent RVF infection.*

17 *Humans are susceptible to infection and get contaminated through contact with infected animal*  
 18 *material (body fluids or tissues) or mosquito bites. Infection of humans by vectors is a striking feature*  
 19 *in countries with a relatively small population of animal hosts. In such areas, RVF may be recognised*  
 20 *first in humans. RVFV has also caused serious infections disease in laboratory workers and must be*  
 21 *handled with high level biosecurity/containment. It is recommended that laboratory workers be*  
 22 *vaccinated if possible.*

23 **Identification of the agent:** *RVFV consists of a single serotype of a bunyavirus of the genus*  
 24 *Phlebovirus that has morphological and physicochemical properties typical of bunyaviruses this*  
 25 *genus.*

26 *Identification of RVFV can be achieved by virus isolation, antigen-detection enzyme-linked*  
 27 *immunosorbent assay (ELISA) or immunopathology. Viral RNA can be detected by reverse*  
 28 *transcription-polymerase chain reaction.*

29 *The virus can be isolated from blood, preferably collected with in an anticoagulant, during the febrile*  
 30 *stage of the disease, or from organs (e.g. liver, spleen and brain tissues) of animals that have died*  
 31 *and from the organs of aborted fetuses. Primary isolations are usually made on cell cultures of various*  
 32 *types, such as African green monkey kidney (Vero) and baby hamster kidney (BHK) cells, chicken*  
 33 *embryo reticulum, or primary cells of sheep or cattle origin. Alternatively, sucking hamsters, adult or*  
 34 *suckling mice, embryonated chicken eggs or 2-day-old lambs may be used for primary virus isolation.*

35 *A rapid diagnosis can be achieved by using the supernatant of homogenised samples as antigen in*  
 36 *virus neutralisation (VN) tests; immunofluorescent staining of impression smears of liver, spleen, brain*  
 37 *or infected cell cultures; or by the demonstration of virus in serum, taken during the febrile stage of the*  
 38 *disease, by enzyme immunoassay or immunodiffusion.*

39 *The presence of characteristic histopathological lesions in the liver assists in the diagnosis.*

40 **Serological tests:** *Identification of specific antibodies is mostly achieved by ELISA or virus*  
 41 *neutralisation test. Infected animals develop specific antibodies that may become demonstrable by VN*  
 42 *as early as 3 days following infection and after 6–7 days by enzyme-linked immunosorbent assay, and*  
 43 *by haemagglutination inhibition. Serological tests used less often include immunofluorescence,*  
 44 *complement fixation and immunodiffusion.*

45 ~~**Requirements for vaccines and diagnostic biologicals:** Live attenuated or inactivated virus~~  
 46 ~~vaccines and antigens for can be used in countries where RVF is endemic or at risk of introduction~~  
 47 ~~during outbreaks. These vaccines should preferably be prepared from nonpathogenic mouse or~~  
 48 ~~mutagen-attenuated strains of RVFV grown in cell cultures. The mutagen-attenuated strain of RVF is~~  
 49 ~~not yet at a stage where it can be recommended for use.~~

50 In RVF-free countries, vaccines and diagnostic tests should preferably be limited to those using  
 51 inactivated virus. Work with live virus should be performed by trained personnel in biocontainment  
 52 facilities following appropriate biosafety procedures.

53 ~~Suitable virus strains can be obtained from the There are two OIE Reference Laboratories for RVF~~  
 54 ~~(see Table given in Part 3 of this Terrestrial Manual).~~

## 55 A. INTRODUCTION

56 ~~Rift Valley fever (RVF) virus consists of a single serotype of a bunyavirus of the genus Phlebovirus and has~~  
 57 ~~morphological and physicochemical properties typical of bunyaviruses. The virus is enveloped, spherical and 80–~~  
 58 ~~120 nm in diameter. Short Glycoprotein spikes project through a bilayered lipid envelope. The virus is readily~~  
 59 ~~inactivated by lipid solvents and acid conditions below pH 6. RVF virus (RVFV) has a three-segmented, single-~~  
 60 ~~stranded, negative-sense RNA genome and consists of the three segments: L (large), M (medium) and S (small),~~  
 61 ~~each of which is contained in a separate nucleocapsid within the virion. The S segment is ambisense RNA, i.e. has~~  
 62 ~~bi-directional coding (Gentsch & Bishop, 1979).~~

63 Rift Valley fever (RVF) is a peracute or acute, febrile, mosquito-borne, zoonotic disease caused by a virus of the  
 64 family *Bunyaviridae*, genus *Phlebovirus*. It is usually presents in epizootic form over large areas of a country  
 65 following heavy rains and flooding, and is characterised by high rates of abortion and neonatal mortality, primarily in  
 66 sheep, goats, cattle and camels. The susceptibility of different species and breeds to RVF may vary considerably.  
 67 Some indigenous African animals may have only inapparent infections, while exotic or others breeds suffer severe  
 68 clinical disease with mortality and abortion. Susceptible, older non-pregnant animals and some other species usually  
 69 often do not show signs of disease. Camels have been regularly involved in the RVF epidemics in East Africa and  
 70 Egypt. Clinical disease is not seen in adult camels, but abortion occurs and some early post-natal deaths have been  
 71 observed.

72 Signs of the disease tend to be nonspecific, rendering it difficult to recognise individual cases (Coackley *et al.*, 1967;  
 73 Coetzer, 1982; Coetzer & Barnard, 1977; Easterday, 1965; Gerdes, 2004; Meegan & Bailey, 1989; Swanepoel &  
 74 Coetzer, 1994; Weiss, 1957) during epidemics; however, the occurrence of numerous abortions and mortalities  
 75 among young animals, together with disease in humans, is characteristic of RVF. RVF has a short incubation period:  
 76 of about 12–36 hours in lambs. A biphasic fever of up to 41°C may develop, and the fever remains high until shortly  
 77 before death. Affected animals are listless, disinclined to move or feed, and may show enlarged superficial lymph  
 78 nodes and evidence of abdominal pain. Lambs rarely survive longer than 36 hours after the onset of signs of illness.  
 79 Animals older than 2 weeks may die peracutely, acutely or may recover or develop an inapparent infection. Some  
 80 animals may regurgitate ingesta and may show melaena or bloody, foul-smelling diarrhoea and bloodstained  
 81 mucopurulent nasal discharge. Icterus may sometimes be observed, particularly in cattle. In addition to these signs,  
 82 adult cattle may show lachrymation, salivation and dysgalactia. In pregnant sheep, the mortality and abortion rates  
 83 vary from 5% to almost 100% in different outbreaks and between different flocks. The death rate in cattle is usually  
 84 less than 10%. Camels have been regularly involved in the RVF epidemics in East Africa, Egypt and more recently  
 85 Mauritania. Clinical disease is usually not seen in adult camels, but sudden deaths, abortion and some early post-  
 86 natal deaths have been observed. Differential diagnosis includes: bluetongue, Wesselsbron disease, enterotoxemia  
 87 of sheep, ephemeral fever, brucellosis, vibriosis, trichomonosis, Nairobi sheep disease, heartwater, ovine enzootic  
 88 abortion, toxic plants, bacterial septicaemias, peste des petits ruminants, anthrax and Schmallenberg disease.

89 The hepatic lesions of RVF are very similar in all species, varying mainly with the age of the infected individual  
 90 (Coetzer, 1982). The most severe lesion, occurring in aborted fetuses and newborn lambs, is a moderately to greatly  
 91 enlarged, soft, friable liver with a yellowish-brown to dark reddish-brown colour with irregular congested patches.  
 92 Numerous greyish-white necrotic foci are invariably present in the parenchyma, but may not be clearly discernible. In  
 93 adult sheep, the lesions are less severe and pinpoint reddish to greyish-white necrotic foci are distributed throughout  
 94 the parenchyma. Haemorrhage and oedema of the wall of the gallbladder are common. Hepatic lesions in lambs are  
 95 almost invariably accompanied by numerous small haemorrhages in the mucosa of the abomasum. The contents of  
 96 the small intestine and abomasum can be ~~are~~ dark chocolate-brown as a result of the presence of partially digested  
 97 blood. In all animals, the spleen and peripheral lymph nodes can be ~~are~~ enlarged, oedematous and may have  
 98 petechiae.

99 Microscopically, hepatic necrosis is the most obvious lesion of RVF in both animals and humans. In fetuses and  
 100 neonates of cattle and sheep, foci of necrosis consist of dense aggregates of cellular and nuclear debris, some fibrin  
 101 and a few inflammatory cells. There is a severe lytic necrosis of most hepatocytes and the normal architecture of the

102 liver is lost. In about 50% of affected livers, intranuclear inclusion bodies that are eosinophilic and oval or rod-shaped  
 103 are found. Mineralisation of necrotic hepatocytes is also seen. In adult animals, hepatic necrosis is less diffuse and  
 104 in sheep, icterus is more common than in lambs (Coetzer, 1982; Swanepoel & Coetzer, 1994).

105 In humans, RVF infections are usually inapparent or associated with a moderate to severe, nonfatal, influenza-like  
 106 illness (Madani *et al.*, 2003; McIntosh *et al.*, 1980; Meegan, 1981). A minority of patients may develop ~~ocular-retinal~~  
 107 lesions, encephalitis, or severe hepatic disease with haemorrhagic manifestations, which is generally fatal.

108 RVF virus (RVFV) has caused serious human infections in laboratory workers. Staff should ~~either~~ be vaccinated  
 109 when a vaccine is available and work should be performed under high containment level with respiratory protection  
 110 ~~3, work under containment level 4 conditions, or wear respiratory protection~~. Particular care needs to be exercised  
 111 when working with infected animals or when performing *post-mortem* examinations (see Chapter 1.1.3 *Biosafety and*  
 112 *biosecurity in the veterinary microbiology laboratory and animal facilities*).

113 RVFV consists of a single serotype of the *Bunyaviridae* family (genus *Phlebovirus*) and has morphological and  
 114 physicochemical properties typical of bunyaviruses. The virus is enveloped, spherical and 80–120 nm in diameter.  
 115 Glycoprotein spikes project through a bilayered lipid envelope. The virus is readily inactivated by lipid solvents and  
 116 acid conditions below pH 6. RVFV has a three-segmented, single-stranded, negative-sense RNA genome and  
 117 consists of the following segments: L (large), M (medium) and S (small), each of which is contained in a separate  
 118 nucleocapsid within the virion. The S segment is an ambisense RNA, i.e. has bi-directional coding (Giorgi, 1991).

119 No significant antigenic differences have been demonstrated between RVF isolates and laboratory-passaged strains  
 120 from many countries, but differences in pathogenicity between genotypes have been shown (Bird *et al.*, 2007;  
 121 Swanepoel *et al.*, 1986).

122 ~~Infection of humans by mosquito vectors is a striking feature in countries, such as Egypt, with a relatively small~~  
 123 ~~population of animal hosts and a large population of mosquitoes.~~

124 RVFV is endemic in many African countries and may involve several countries in the region at the same time or  
 125 progressively expand geographically over the course of a few years. In addition to Africa, large outbreaks have been  
 126 observed in the Arabian Peninsula and some Indian Ocean Islands usually occurs in epizootics in Africa, which may  
 127 involve several countries in a region at one and the same time. These generally, but not exclusively, follow the  
 128 periodic cycles of unusually heavy rainfall, which may occur at intervals of several years very rarely in semi-arid  
 129 zones (25–35 year cycles), or more frequently (5–15 year cycles) in higher rainfall savannah grasslands, or the  
 130 flooding of wide areas favouring the proliferation of mosquitoes.

131 Rainfall facilitates mosquito eggs to hatch. *Aedes mosquitoes* acquire the virus from feeding on infected animals,  
 132 and may potentially vertically transmit the virus, so that new generations of infected mosquitoes may hatch from their  
 133 eggs (Linthicum, 1985). This provides a potential mechanism for maintaining the virus in nature, as the eggs of these  
 134 mosquitoes may survive for periods of up to several years in dry conditions. Once livestock is infected, a wide variety  
 135 of mosquito species may act as the vector for transmission of RVFV and can spread the disease.

136 Low level ~~undetectable~~ RVF activity may take place during inter-epizootic periods. RVF should be suspected when  
 137 exceptional unusually flooding and subsequent abundant mosquitoes populations heavy rains are followed by the  
 138 occurrence of abortions together with fatal disease marked by necrosis and haemorrhages in the liver that  
 139 particularly affect newborn lambs, kids and calves, potentially concurrent with the occurrence of an influenza-like  
 140 illness in farm workers and people handling raw meat.

141 During an outbreak, preventive measures to protect workers from infection should be employed when there are  
 142 suspicions that RVF-virus-infected animals or animal products ~~meat and tissue samples~~ are to be handled.

## 143 B. DIAGNOSTIC TECHNIQUES

144 The collection of specimens and their transport should comply with the Chapter 1.1.1 *Collection and storage of*  
 145 diagnostic specimens and Chapter 1.1.2 *Transport of specimens of animal origin* of this *Terrestrial Manual*.

146 Proper diagnosis should always use a combination of techniques based on history, the purpose of the testing and  
 147 the stage of the suspected infection. For a definitive interpretation, combined epidemiological, clinical and laboratory  
 148 information should be evaluated carefully.

149 All the test methods described below should be validated in each laboratory using them (see Chapter 1.1.5  
 150 *Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases* of this *Terrestrial Manual*). The OIE  
 151 Reference Laboratories for RVF should be contacted for technical support. Table 1 provides a general guidance



152 summary on the use of the diagnostic tests methods. More detailed aspects are addressed in the test descriptions  
 153 that follow.

154 **Table 1. Test methods available and their purposes**

<b><u>Method</u></b>	<b><u>Purpose</u></b>					
	<b><u>Population freedom from infection (non-vaccinated animals)</u></b>	<b><u>Individual animal freedom from infection</u></b>	<b><u>Efficiency of eradication policies<sup>1</sup></u></b>	<b><u>Confirmation of clinical cases<sup>2</sup></u></b>	<b><u>Prevalence of infection - surveillance</u></b>	<b><u>Immune status in individual animals or populations post-vaccination</u></b>
<b><u>Virus isolation in cell culture</u></b>	=	=	=	+++	±	n/a
<b><u>Virus isolation in sucking mice</u></b>	=	=	=	±	±	n/a
<b><u>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</u></b>	=	=	=	+++	±	n/a
<b><u>Antigen detection</u></b>	=	=	=	++	±	n/a
<b><u>Histopathology with immuno-histochemistry</u></b>	=	=	=	++	=	n/a
<b><u>Enzyme-linked immunosorbent assay</u></b>	+++	++	+++	++	+++	+++
<b><u>Virus neutralisation</u></b>	+++	+++	+++	++	++	+++

155 Key: +++ = recommended, validated method; ++ = suitable, but requires further validation;  
 156 + = may be used, but should be interpreted with caution; = – not appropriate for this purpose.

## 157 **1. Identification of the agent**

158 RVFV may be isolated from serum but preferentially from plasma or blood collected with anticoagulant during the  
 159 febrile stage of the disease in live animals, or from liver, spleen and brain of animals that have died, or from aborted  
 160 fetuses. Primary isolation is usually performed in hamsters, infant or adult mice, or on cell cultures of various types  
 161 or by intracerebral inoculation of sucking mice.

### 162 **a) Specimen collection**

163 Using appropriate protective equipment to ensure biosafety of the staff, approximately 5 ml of blood with  
 164 anticoagulant (preferably ethylene diamine tetra-acetic acid [EDTA]) collected during the febrile stage of the  
 165 disease or approximately 1 cm<sup>3</sup> of liver, spleen, brain and/or abortion products collected post-mortem should  
 166 be submitted for virus isolation. The samples should be kept at 0–4°C during transit. If transport to the  
 167 laboratory is likely to take more than 24 hours, the samples should be frozen and sent on dry ice or frozen cold  
 168 pack. In case of blood sample, plasma should be collected and frozen for transport.

### 169 **ab) Isolation in cell cultures ~~Culture~~**

170 Approximately 5 ml of blood collected during the febrile stage of the disease or approximately 5 g of liver,  
 171 spleen and brain collected after death should be presented for virus isolation. The samples should be kept at  
 172 0–4°C during transit. If transport to the laboratory is likely to take more than 24 hours, the samples should be  
 173 frozen and sent on dry ice.

1 If vaccination by DIVA vaccines are used in these policies then DIVA discriminatory assays should be useful (ELISA assay because the neutralisation assay do not allow the distinction between antibody following naturally infection or following vaccination)<sup>2</sup>. The sentence between

2 Laboratory confirmation of clinical cases should require a combination of at least two positive results from two different diagnostic test methods: either positive for virus/viral RNA and antibodies or positive for IgM and IgG with demonstration of rising titres between paired sera samples collected 2-4 weeks apart. Depending of the stage of the disease, virus and/or antibodies will be detected.

174 Approximately 1 g of homogenised tissue is suspended 1/10 in cell culture medium or buffered saline, pH 7.5,  
 175 containing sodium penicillin (1000 International Units [IU]/ml), streptomycin sulphate (1 mg/ml), mycostatin  
 176 (100 IU/ml), or fungizone (2.5 µg/ml). The suspension is centrifuged at 1000 *g* for 10 minutes and the  
 177 supernatant fluid is injected intracerebrally into 1–5 day old mice or intraperitoneally into hamsters or adult  
 178 mice. Infant mice will either die or be obviously ill by day 2. Adult mice are affected 1–3 days later. Although  
 179 mice or hamsters are the laboratory animal of choice, lambs and embryonated chicken eggs may also be used.

180 A variety of cell lines monolayers including African green monkey kidney (Vero), baby hamster kidney (BHK)  
 181 chicken embryo reticulum (CER: cells developed by Tsunemasa Motohashi at the Nippon Institute for Biological  
 182 Science, Tokyo, Japan; recharacterised as a hamster line) (4) and AP61 mosquito cells (Digoutte *et al.*, 1989)  
 183 primary kidney or testis cells of calves and lambs may be used. They are inoculated with 1/10–1 ml of clarified  
 184 dilution of the sample supernates and incubated at 37°C for 1 hour (with mosquito cell lines, the incubation  
 185 should be done at 27°C for 1 hour). It is advisable to also inoculate some cultures with a further 1/100 dilution  
 186 of the inoculum. This is to avoid the production of defective particles, which follows the use of very high virus  
 187 inoculum. Some tubes containing flying cover slips should also be prepared. The cultures are washed with  
 188 phosphate buffered saline at room temperature and covered with medium containing 2% serum free from  
 189 antibodies against RVF. The inoculum is removed and the monolayer is washed with phosphate buffered saline  
 190 or culture medium. The wash solution is removed, replaced by fresh culture medium and incubated at  
 191 appropriate temperature. The cultures are observed microscopically for 5–6 days. Mammalian cell lines are  
 192 preferably used since RVFV induces a consistent cytopathic effect (CPE) characterised by slight rounding of  
 193 cells followed by destruction of the whole cell sheet within 12–24 hours. Confirmation of virus isolation should  
 194 be performed preferably by immunostaining or reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-  
 195 PCR). Specific identification of RVF virus antigen may be made 18–24 hours after infection by  
 196 immunofluorescent staining of the cover-slip preparations.

197 The virus may also be detected by immunofluorescence carried out on impression smears of liver, spleen and  
 198 brain. A rapid diagnosis can sometimes be made by demonstrating viral antigen in tissues or in serum of febrile  
 199 animals by a complement fixation or agar gel immunodiffusion (AGID) test. A rapid diagnosis can also be made  
 200 by detection of viral RNA using a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

#### 201 **bc) Isolation in sucking mice Agar gel immunodiffusion**

202 This method should be avoided if possible, for reasons of animal welfare and biosafety. Approximately 1 g of  
 203 homogenised tissue is suspended 1/10 in cell culture medium or buffered saline, pH 7.5, containing sodium  
 204 penicillin (1000 International Units [IU]/ml), streptomycin sulphate (1 mg/ml), mycostatin (100 IU/ml), or  
 205 fungizone (2.5 µg/ml). The suspension is centrifuged at 1000 *g* for 10 minutes and the supernatant fluid is  
 206 injected intracerebrally into 1- to 5-day-old mice. Sucking mice will either die or be obviously ill by day 2 post-  
 207 inoculation.

208 Confirmation of virus isolation should be performed preferably by immunostaining or polymerase chain reaction  
 209 (PCR).

210 The AGID test is useful in laboratories without tissue culture facilities. Approximately 1 gram of tissue,  
 211 preferably liver, is homogenised and made up to a 10–20% suspension in borate saline buffer, pH 9.0. The  
 212 material is centrifuged at 1000 *g* and the supernatant is used in the test. Micro-AGIDs are performed on  
 213 standard microscope slides covered with 3 ml of 1% agarose in borate saline. Patterns of six peripheral wells  
 214 and a central well are prepared and filled with reagents as follows: a positive, preferably hyperimmune serum in  
 215 the central well, positive control antigen in wells 1 and 4, test tissues in wells 2 and 5 and negative tissues in  
 216 wells 3 and 6. A precipitin line of continuity should be formed between control antigen and positive serum that  
 217 extends to include a line between test tissue and serum for a case to be considered positive.

#### 218 **ed) Reverse transcription polymerase chain reaction**

219 A rapid diagnosis can also be made by detection of viral RNA (Sall *et al.*, 2001) using validated conventional or  
 220 real-time RT-PCR (Bird *et al.*, 2007; Drosten *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2001; Le Roux *et al.*, 2009; Sall *et al.*,  
 221 2001). These techniques were very useful during RVF outbreaks in Africa. The PCR was used, among other  
 222 techniques, for antigen detection in two recent RVF virus outbreaks in Africa — one in Kenya in 1998 and a  
 223 limited outbreak in South Africa in 1999. It may also be used to detect RVFV in mosquito pools (Jupp *et al.*,  
 224 2000). RT-PCR followed by sequencing of the NS(S) protein coding region has been used in phylogenetic  
 225 analysis to characterise two distinct lineages of RVF virus — one Egyptian and the other sub-Saharan — making  
 226 this technique a powerful molecular epidemiological tool (29).

227 This technique should be followed by sequencing on selected samples. Below are proposed protocols for  
 228 conventional and real time RT-PCR. For information on specific procedures consult the OIE Reference  
 229 Laboratories.

230 **Agarose gel-based RT-PCR assay**

231 This procedure is used at the OIE Reference Laboratories. The RT-PCR assay consists of the three successive  
 232 procedures of (a) extraction of template RNA from the test or control sample followed by (b) RT of the extracted  
 233 RNA, (c) PCR amplification of the RT product and (d) detection of the PCR products by agarose gel  
 234 electrophoresis.

235 • **Test procedure**

236 RNA is extracted by an appropriate chemical method according to the procedure recommended by the  
 237 commercial kit's manufacturers. When the procedure is finished, keep the extracted RNA samples on ice if the  
 238 RT step is about to be performed. Otherwise store at -20°C or -70°C. For RT-PCR, the protocol from Sall *et al.*  
 239 (2001) are used. For the first RT-PCR step, NSca (5'-CCT-TAA-CCT-CTA-ATC-AAC-3') and NSng (5'-TA-TCA-  
 240 TGG-ATT-ACT-TTC-C-3') primers are used.

241 i) Prepare the PCR mix described below for each sample. It is recommended to prepare the mix in bulk for  
 242 the number of samples to be tested plus one extra sample.

243 Nuclease-free water (15.5 µl); RT-PCR reaction buffer, 5x conc (10 µl); MgCl<sub>2</sub>, 25 mM (1 µl); dNTPs,  
 244 10 mM mixture each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP (1 µl); primer NSca, 10 µM (2.5 µl); primer NSng  
 245 10 µM (2.5 µl); Enzyme Mix, 5 units/µl (0.25 µl).

246 ii) Add 40 µl of PCR reaction mix to a well of a PCR plate or to a microcentrifuge tube for each sample to be  
 247 assayed followed by 10 µl of the RNA (prepared in step ix) to give a final reaction volume of 50 µl.

248 iii) Spin the plate or tubes for 1 minute in a suitable centrifuge to mix the contents of each well.

249 iv) Place the plate in a thermal cycler for PCR amplification and run the following programme:

250 45°C for 30 minutes: 1 cycle;

251 95°C for 2 minutes: 1 cycle;

252 94°C for 30 seconds, 44°C for 30 seconds, 72°C for 1 minute: 40 cycles;

253 72°C for 5 minutes: 1 cycle.

254 v) Mix a 20 µl aliquot of each PCR reaction product with 4 µl of staining solution and load onto a 1.2%  
 255 agarose gel. After electrophoresis a positive result is indicated by the presence of a 810 bp (242 bp for  
 256 Clone 13) band corresponding to RVFV sequence in the NSs coding region of the S segment of the  
 257 genome.

258 For the nested RT-PCR step, NS3a (5'-ATG-CTG-GGA-AGT-GAT-GAG-CG-3') and NS2g (5'-GAT-TTG-  
 259 CAG-AGT-GGT-CGT-C-3') are used.

260 vi) Prepare the PCR mix described below for each sample. It is recommended to prepare the mix in bulk for  
 261 the number of samples to be tested plus one extra sample.

262 Nuclease-free water (35.5 µl); RT-PCR reaction buffer, 10x conc (5 µl); MgCl<sub>2</sub>, 25 mM (1.25 µl); dNTPs,  
 263 10 mM mixture each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP (1 µl); primer NS3a (5'-ATG-CTG-GGA-AGT-GAT-  
 264 GAG-CG-3'), 10 µM (2.5 µl); primer NS2g (5'-GAT-TTG-CAG-AGT-GGT-CGT-C-3'), 10 µM (2.5 µl);  
 265 Enzyme Mix, 5 units/µl (0.25 µl).

266 vii) Add 49 µl of PCR reaction mix to a well of a PCR plate or to a microcentrifuge tube for each sample to be  
 267 assayed followed by 1 µl of the amplicon obtained from RT-PCR reaction with NSca and NSng to give a  
 268 final reaction volume of 50 µl.

269 viii) Spin the plate or tubes for 1 min in a suitable centrifuge to mix the contents of each well.

270 ix) Place the plate in a thermal cycler for PCR amplification and run the following programme:

271 95°C for 2 minutes: 1 cycle;

272 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute, 72°C for 1 minute: 25 cycles;

273 72°C for 5 minutes: 1 cycle.

274 x) Mix a 20 µl aliquot of each PCR reaction product with 4 µl of staining solution and load onto a 1.2%  
 275 agarose gel. After electrophoresis a positive result is indicated by the presence of a 668 bp (129 bp for  
 276 Clone 13) band corresponding to RVFV sequence in the NSs coding region of the S segment of the  
 277 genome.

278

279 **Real-time RT-PCR assay**

280 The real-time RT-PCR assay can use the same procedures of extraction of total RNA from the test or control  
 281 sample followed by RT of the extracted RNA as for the conventional procedure. The protocol is adapted from  
 282 Drosten *et al.* (2002). If commercial kits are used the manufacturer's method should be followed.

283 • **Test procedure**

284 i) Prepare the PCR mix described below for each sample. Again it is recommended to prepare the mix in  
 285 bulk for the number of samples to be tested plus one extra sample: nuclease-free water (1.4 µl); RT-PCR  
 286 reaction master mix, 2× conc. (10 µl); real-time PCR forward primer **RVS**: 5'-AAA-GGA-ACA-ATG-GAC-  
 287 TCT-GGT-CA-3', 10 µM (2 µl); real-time PCR reverse primer **RVAs**: 5'-CAC-TTC-TTA-CTA-CCA-TGT-  
 288 CCT-CCA-AT-3', 10 µM (2 µl); **RVP**: **FAM** 5'-AAA-GCT-TTG-ATA-TCT-CTC-AGT-GCC-CCA-A-3'  
 289 **TAMRA** 20 µM (0.2 µl).

290 ii) Add 17 µl PCR reaction mix to a well of a real-time PCR plate for each sample to be assayed followed by  
 291 3 µl of the prepared RNA to give a final reaction volume of 20 µl.

292 iii) Spin the plate for 1 minute in a suitable centrifuge to mix the contents of each well.

293 iv) Place the plate in a real-time PCR machine for PCR amplification and run the following programme:

294 45°C for 30 minutes: 1 cycle;

295 95°C for 5 minutes: 1 cycle;

296 95°C for 5 seconds, 57°C for 35 seconds: 45 cycles.

297 v) *Reading the results*: Assign a threshold cycle (CT) value to each PCR reaction from the amplification plots  
 298 (a plot of the fluorescence signal versus cycle number; different cut-off values may be appropriate for  
 299 different sample types; Parida *et al.* (2007). The CT values used to assign samples as either RVFV  
 300 positive or negative should be defined by individual laboratories using appropriate reference material.

301 **e) Antigen detection**

302 The antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is an immunocapture test. Samples are  
 303 tested at different dilutions with appropriate positive and negative controls. This test has been used for human  
 304 and animal samples during outbreaks in Saudi Arabia and Kenya (Madani *et al.*, 2003; Munyua *et al.*, 2010).

305 • **Test procedure**

306 i) The controls and antisera used in the performance of this assay have been treated to kill any RVFV that  
 307 may have been in them at the time of production. Within the limits of our ability to detect viable virus these  
 308 products are safe. The material to be tested for the presence of RVF viral antigen is potentially  
 309 contaminated with viable RVFV or other agents for which a differential determination is being sought.  
 310 Good laboratory practices should be used at minimum. Samples could be inactivated using appropriate  
 311 detergent and heat inactivation.

312 ii) The basic approach is that of a double antibody sandwich capture assay in which the antigen is captured  
 313 by antibody on a solid phase and then detected by a second antibody. A detection system using the  
 314 horseradish peroxidase (HRPO)-ABTS is then applied to determine how much of the detection antibody  
 315 has been retained on the solid phase of the system.

316 iii) *Capture (coating) antibody (diluted 1/2000 in PBS [no Tween] pH 7.4 and coated overnight at 4°C; control*  
 317 *wells are coated with a similar dilution of normal fluid)*: Plates are coated with a specific anti-viral antibody  
 318 (available in OIE or WHO Reference Laboratories) capable of capturing viral antigen from the test sample.  
 319 Normal serum is added to rows to serve as controls used to determine the non-specific background or  
 320 noise of the system. In this instance it is a hyperimmune mouse ascitic fluid (HMAF) (it could also be  
 321 monoclonal antibodies) specific for RVF viruses.

322 iv) *Suspect samples and control antigen (diluted 1/4 and then diluted four-fold, down the plate)*: These are  
 323 added in serum diluent to allow specific viral antigens to bind to the capture antibody. Serum diluent  
 324 (phosphate buffered saline, 0.01 M, pH 7.4, with or without thiomersal) contains 5% skim milk and 0.1%  
 325 Tween 20 to reduce nonspecific binding.

326 v) *Detection antibody*: An antibody, high titred for specific viral antigen, is added to allow detection of the  
 327 bound viral antigen. In this experiment, it is an anti-RVF hyperimmune rabbit serum (available in OIE or  
 328 WHO Reference Laboratories) that has a high titre against RVF viruses.

329 vi) *Anti-rabbit conjugated to HRPO (commercial product)*: Used to detect the rabbit anti-RVF that binds to the  
 330 antigen.

331 vii) *Criteria for determining positives*. A standard control antigen has been provided and will be run in a  
 332 standard dilution series. This, in effect, provides a standard curve which will determine the limits of

333 detection of the assay. A group of normal tissues or samples, uncontaminated with antigen, are tested to  
 334 determine the background of the assay and the limit at which the standard was positive. The values of  
 335 these normal controls are used to generate the mean and standard deviation of the random background  
 336 to be expected with negative samples. A sample is considered positive if its optical density (OD) value  
 337 exceeds the mean plus 3 standard deviations of these normal controls.

#### 338 **df) Histopathology**

339 Histopathological examination of the liver of affected animals will reveal characteristic cytopathology, and  
 340 immunostaining will allow the specific identification of RVF viral antigen in infected cells tissue (Coetzer, 1982;  
 341 Swanepoel *et al.*, 1986). This is an important diagnostic tool because liver or other tissue placed in formal  
 342 saline-neutral buffered formaldehyde in the field is inactivated for diagnostic purposes and does not require a  
 343 cold chain, which facilitates handling and transport from remote areas remote from the laboratory.

## 344 **2. Serological tests**

345 Samples collected from animals for antibody testing may contain live virus and appropriate inactivation steps should  
 346 be put in place. A combination of heat and chemical inactivation has been described (Van Vuren & Paweska, 2010).  
 347 Immunofluorescence assays are still used, although cross-reactions may occur between RVFV and other  
 348 phleboviruses. Techniques such as agar gel immunodiffusion (AGID), radioimmunoassays, haemagglutination  
 349 inhibition (HI), and complement fixation are no longer used.

350 Several assays are available for detection of anti-RVFV antibodies in a variety of animal species. Currently the most  
 351 widely used technique is the ELISA for the detection of IgM and IgG. Virus neutralisation tests (VNT) including  
 352 microneutralisation, plaque reduction neutralisation (PRN) and neutralisation in mice have been used to detect  
 353 antibodies against RVFV in the serum of a variety of species. Neutralisation tests are the most specific diagnostic  
 354 serological tests and will record the earliest response, but these tests can only be performed with live virus and are  
 355 not recommended for use outside endemic areas and/or in laboratories without appropriate biosecurity facilities and  
 356 vaccinated personnel. However, alternative neutralisation assays not requiring handling of highly virulent RVFV and  
 357 not requiring high containment, are being developed and validated.

358 Other available tests include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), haemagglutination inhibition (HI), AGID,  
 359 immunofluorescence, radioimmunoassay and complement fixation. In these tests, however, cross-reactions may  
 360 occur between RVF virus and other phleboviruses. An advantage of these tests is the fact that they can be  
 361 performed with inactivated antigen and can therefore be used in RVF free countries.

#### 362 **a) Enzyme-linked immunosorbent assay**

363 The ELISA is a reliable and sensitive test that may be employed with several species to detect antibodies  
 364 against RVFV. Both IgG and IgM ELISAs are available for most species. IgM-capture ELISA allows diagnosis  
 365 of recent infections to be made on a single serum sample.

366 A number of ELISAs using different formats are commercially available and others are under development  
 367 (Afetine *et al.*, 2007; Cettre-Sossah *et al.*, 2009; Jansen Van Vuren *et al.*, 2007; Madani *et al.*, 2003; Munyua *et*  
 368 *al.*, 2010; Paweska *et al.*, 2003; Paweska *et al.*, 2005; Van Vuren & Paweska, 2010). They are used routinely in  
 369 many countries for single case diagnosis, outbreak management, and surveillance.

370 The HI test can be employed with great confidence in nonendemic areas. However, sera from individuals that  
 371 have had previous infections with phleboviruses other than RVF may react with RVF antigen to titres as high as  
 372 40 and, rarely, to titres of 320 (33). In suspected cases, the OIE Reference Laboratory for RVF (see Table  
 373 given in Part 3 of this *Terrestrial Manual*) can be of assistance in carrying out neutralisation tests for specificity.  
 374 The HI antibody titre after vaccination with RVF virus vaccine may be as high as 640 or, rarely, 1280, whereas  
 375 titres following natural infections with RVF virus are usually significantly higher.

376 Below are two such tests used at the OIE Reference Laboratory for RVF at ARC-Onderstepoort Veterinary  
 377 Institute. Both assays use 10% non-fat milk/Tris salt Tween (NFM/TST) as blocking and dilution buffer and TST  
 378 buffer: 50 mM Tris/150 mM NaCl/0.1% Tween 20 as washing buffer (pH 8.0). The reactions are stopped with  
 379 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

380 The recombinant nucleoprotein (rN) of RVFV is produced and purified as described by Williams *et al.* (2011).  
 381 Conjugation of the protein to HRPO is performed as per the Nakane & Akira Kawaoi (1974) protocol. The rN  
 382 antigen is stable for up to 1 year at 4°C.

383 To prepare plates for immediate use, make a checkerboard titration of the capture antibody or antigen against  
 384 the conjugate in a 96-well ELISA plate to determine the minimum reagent concentration that would give an OD

385 value of 0.5–0.6 when read at 650 nm after an incubation period of 20 minutes. This will inform how the  
386 antibody/antigen and conjugate must be diluted for coating of the plates and detection of the antigen/antibody  
387 binding in the test.

### 388 **IgM capture ELISA**

#### 389 • **Test procedure**

390 i) Coat each well of the 96-well ELISA plates with 100 µl of the capture antibody (affinity purified Rabbit anti-  
391 sheep IgM1) diluted to 1 µg/ml in PBS (that is a 1/1000 dilution if so determined by the titration), and  
392 incubate overnight at room temperature in a humid chamber.

393 ii) Wash the plates three times with wash buffer.

394 iii) Block the plates with 300 µl blocking buffer and incubate for 1 hour at 37°C.

395 iv) Wash the plates again three times with wash buffer.

396 v) Dilute both control (positive and negative) and test sera 1/100 in blocking buffer and add each serum in a  
397 designated well at volumes of 100 µl /well.

398 vi) Incubate the plates for 1 hour at 37°C. Avoid drying by putting plates in a humid chamber.

399 vii) Following the incubation step, wash the ELISA plates with wash buffer three times.

400 viii) Dilute the rN-HRP conjugate 1/6000 and add 100 µl of this in each well. Use blocking buffer as the  
401 conjugate control (cc).

402 ix) The plates are then incubated for 60 minutes at 37°C.

403 x) The plates are washed, as in step ii above. Ready to use tetra methyl benzidine (TMB) substrate at 100 µl  
404 quantities is then transferred to each well, and the plates allowed to stand at room temperature for a few  
405 minutes, until development of a colour change or OD values of 0.5 when the plates are read at 650 nm.  
406 Exposure to direct light should be avoided.

407 xi) Stop the reaction with 100 µl stop solution, and read the OD values using an ELISA plate reader at 450  
408 nm.

409 xii) *Interpretation of results:* results are expressed as percentage of the positive serum control (PP) using the  
410 formula: [(mean OD of duplicate test serum/mean OD of positive control)]x100, where a positive and  
411 negative cut-off values are determined by receiver operating characteristic (ROC) curve analysis.

412 It should be noted that the cut-off value for an ELISA can be adjusted for different target populations as well as  
413 for different diagnostic purposes (Jacobson, 1998). The cut-off values determined by the recent validation  
414 exercise at ARC-OVI are the following: PP (%) values: negative <4; suspicious 4–5; positive>6.

### 415 **Indirect IgG ELISA**

#### 416 • **Test procedure**

417 i) Coat each well of the 96 well ELISA plate with 100 µl of rN diluted in 50mM of carbonate buffer (pH 9.6)  
418 using the dilution ratio determined by prior titration as explained above; and incubate overnight at room  
419 temperature in a humid chamber.

420 ii) Wash the plates three times with approximately 300 µl wash buffer per well.

421 iii) Block the plates with approximately 300 µl blocking buffer and incubate for 1 hour at 37°C.

422 iv) Wash the plates again three times with nearly 300 µl of wash buffer per well.

423 v) Dilute both control (positive and negative) and test sera 1/100 in blocking buffer.

424 vi) Add 100 µl of the diluted sera in designated wells in duplicate.

425 vii) Incubate the plates for 1 hour at 37°C. Avoid drying by putting plates in a humid chamber.

426 viii) Following the incubation step, wash the ELISA plates with wash buffer three times.

427 ix) Dilute Protein G-HRP conjugate 1/32000 in blocking buffer and add 100 µl of the conjugate in each well.

428 x) Incubate for 60 minutes at 37°C.

429 xi) The plates are washed, as in step ii above. Add 100 µl of ready to use TMB substrate to each well and  
430 allow the plates to stand at room temperature for a few minutes, while avoiding exposure to direct light.  
431 The plates are read at 650 nm to determine if OD of 0.4–0.6 has been reached.

432 xii) Stop the reaction with 100 µl stop solution, and read the plates using ELISA plate reader at 450 nm.

433 xiii) Interpretation of results: results are expressed as percentage of the positive serum (PP) using the  
 434 formula: [(mean OD of duplicate test serum/mean OD of positive control)]x100, where a positive-negative  
 435 cut-off is determined by receiver operating characteristic (ROC) curve analysis.

436 It should be noted that the cut-off value for an ELISA can be adjusted for different target populations as well as  
 437 for different diagnostic purposes (Jacobson, 1998). The cut-off values determined by the recent validation  
 438 exercise at ARC-OVI are the following: PP values (%): negative <4; suspicious 4-6; positive>7.

#### 439 **b) Virus neutralisation (the prescribed test for international trade)**

440 The VN test may be employed to determine the presence of antibodies in naturally infected animals and in  
 441 vaccinated animals-vaccinated with RVF vaccine. The test is highly specific and can be used to test serum of  
 442 any species. It is generally used to measure vaccine efficacy. Factors other than neutralising antibodies may  
 443 play a part in resistance to RVF. The Smithburn neurotropic mouse brain strain of highly attenuated RVFV  
 444 (Smithburn, 1949) or any other, preferably attenuated, RVFV, also referred to as modified live virus and  
 445 adapted to cell culture is used as challenge virus. The virus antigen is stored at -80°C, or 4°C in freeze-dried  
 446 form. The stock is titrated to determine the dilution that will give 100 TCID<sub>50</sub> (50% tissue culture infective dose)  
 447 in 25 µl under the conditions of the test.

##### 448 • **Test procedure**

- 449 i) Inactivate the test sera for 30 min in a water bath at 56°C.
- 450 ii) Add 25 µl of cell culture medium with 5% RVF-negative serum and antibiotics to each well of a 96-well cell  
 451 culture plate.
- 452 iii) Add 25 µl of test serum to the first well of each row and make twofold dilutions. Titrate each serum in  
 453 duplicate from 1/10 to 1/80 for screening purposes or in quadruplet and to higher dilutions for  
 454 determination of end-point titres. Include known positive and negative control sera.
- 455 iv) Add 25 µl per well of RVFV antigen (diluted in cell culture medium and calculated to provide 100 TCID<sub>50</sub>  
 456 per well) to each well that contains diluted test serum and to wells in rows containing negative and  
 457 positive control serum. In addition, make twofold dilutions of challenge virus antigen in at least two rows  
 458 each containing cell culture medium only.
- 459 v) Incubate for 30 min at 37°C.
- 460 vi) Add 50 µl per well of Vero, BHK CER or any other suitable cell suspension at 3 x 10<sup>5</sup> cells/ml or at a  
 461 dilution known to produce a confluent monolayer within 12 hours.
- 462 vii) Incubate the plates in an atmosphere of 3-5% CO<sub>2</sub> for 3-5 days.
- 463 viii) Using an inverted microscope, the monolayers are examined daily for evidence of CPE. There should be  
 464 no CPE in rows containing positive control serum and clear evidence of CPE in rows containing negative  
 465 control serum indicating the presence of virus. Determine the results by the Spearman-Kärber method.

#### 466 **b) Enzyme-linked immunosorbent assay**

467 For the serodiagnosis of RVFV a number of ELISAs using different formats have been published and are  
 468 commercially available (1, 28). The use of inactivated whole virus or mouse liver antigens has recently been  
 469 replaced by recombinant nucleocapsid (N) protein as antigen.

470 These ELISAs are at present in an indirect format and apart from the very important safety consideration also  
 471 have the advantage of antigen stability and the ability to test 40 sera in duplicate per plate instead of only 20.

472 An indirect ELISA with pre-coated plates using a nucleocapsid protein (NC) recombinant antigen and Protein G  
 473 peroxidase conjugate is described below (17).

##### 474 • **Test procedure**

475 Unless otherwise stated, all dilutions are made with 10% (w/v) dried milk buffer and all washes performed three  
 476 times with volumes of 250-300 µl/well.

- 477 i) Using pre-coated plates add 50 µl of diluted (1/100) serum in duplicate wells
- 478 ii) Add control sera at predetermined dilutions in duplicate wells. Incubate for 60 minutes at 37°C. Wash the  
 479 plate.
- 480 iii) Add Protein G/horseradish peroxidase conjugate at a working dilution to all wells of the plate. Incubate for  
 481 60 minutes at 37°C. Wash the plate

- 482 iv) Add 50 µl of ready-to-use TMB Substrate to all wells of the plate. Cover the plate and incubate at room  
 483 temperature in the darkness for 20–30 minutes.
- 484 v) Add 50 µl of ready-to-use Stop solution to all wells of the plate. Tap plate gently to allow contents to mix.  
 485 Wait 5 minutes and read plate using a spectrophotometer equipped with a 450 nm filter.
- 486 vi) Suggested plate layout.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CC	CC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
B	CC	CC	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C	C++	C++	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
D	C++	C++	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
E	C+	C+	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
F	C+	C+	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
G	C-	C-	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
H	C-	C-	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40

487 CC: Conjugate control; C++: High positive control serum; C+: low positive control serum;  
 488 C-: negative control serum; 1–40: test samples.

489 Newer ELISA formats are being introduced, including formats that are more specific for IgG and IgM (27).

490 **e) Haemagglutination inhibition**

491 The HI test adapted to a microtechnique is based on Clarke & Casals (7). A sucrose/acetone extracted  
 492 hamster liver antigen is used in a 96-well U-bottomed plate test and antigen is diluted so that  
 493 4 haemagglutinating units are used in the test. Nonspecific inhibitors of haemagglutinin are removed by kaolin  
 494 extraction of sera followed by adsorption with packed goose erythrocytes (RBC) prior to testing. Doubling  
 495 dilutions of sera made in borate saline buffer, pH 9, are tested against equal volumes of antigen. Plates are  
 496 held overnight at 4°C before the addition of 50 µl of 0.5% RBC to each of the wells. Plates are read after  
 497 30 minutes at room temperature and end-points are recorded as the reciprocal of the highest serum dilution  
 498 producing complete inhibition of agglutination.

499 Positive and negative control sera are incorporated into each test. A test is considered to be valid only if the  
 500 control sera give the expected results. Sera with titres below 1/40 are considered to be negative.

501 HI is an appropriate screening test for surveys although it is not specific. Marked cross reactions do occur  
 502 between the phleboviruses, but homologous titres exceed heterologous titres. Experimentally, African  
 503 phleboviruses other than RVF have been shown to be nonpathogenic for ruminants, and antibodies that they  
 504 might induce are unlikely to cause confusion in RVF diagnosis (33).

505 **C. REQUIREMENTS FOR VACCINES AND DIAGNOSTIC BIOLOGICALS**

506 This Section has been extensively revised and updated. Although some  
 507 portions of the existing text have been incorporated, new text and deleted text  
 508 have not been marked, in the interests of clarity.

509 **1. Background**

510 Currently available RVF vaccines are either live attenuated or inactivated vaccines.

511



512  
513

Table 2. Summary of the current RVF vaccine strains

	Smithburn live attenuated virus vaccines	Clone-13 live attenuated virus vaccine	Inactivated virus vaccines	TSI-GSD-200 inactivated human vaccine (presently not available)
<b>Origin of the isolate</b>	Mosquito isolate, Uganda, 1948	Human isolate, 1974	Field strains (South Africa and Egypt) used	Mosquito isolate, Uganda, 1944
<b>Attenuation</b>	More than 200 passages in murine brain	Natural deletion in NSs gene	Not applicable	Not applicable
<b>Production substrate</b>	BHK cell line	Vero cell line	BHK cell line	Diploid fetal rhesus lung cell line
<b>Target</b>	livestock	livestock	livestock	human
<b>DIVA policy</b>	No	No	No	Not applicable

514 • *The live attenuated Smithburn RVF vaccine:* the vaccine virus is derived from Smithburn's original neurotropic  
515 strain. This strain is not lethal to adult mice inoculated intraperitoneally and is safe for use in all breeds of cattle,  
516 sheep and goats (Barnard, 1979; Smithburn, 1949). However, it may cause fetal abnormalities or abortion in  
517 pregnant animals. The Smithburn RVF vaccine has been used for decades in the control of RVF in Eastern and  
518 Southern Africa and in the Middle East, and is still used to date in different endemic region.

519 • *The Clone 13 RVF vaccine:* Clone 13 is a naturally attenuated strain characterised by a large deletion of the  
520 gene encoding for the main virulent factor, the NSs (Muller *et al.*, 1995). The risk of reversion is considered  
521 unlikely. No abortion or side effects have been seen in experimental vaccine trials (Dungu *et al.*, 2010; Hunter  
522 & Bouloy, 2001). It was recently introduced in South Africa for use in sheep and cattle using a single injection  
523 regimen.

524 • *The inactivated RVF vaccine:* the currently produced formalin-inactivated vaccines derived from a field strain of  
525 RVFV adapted to growth in cell culture (Barnard, 1979; Barnard & Botha, 1977). These vaccines are currently  
526 adjuvanted in aluminium hydroxide. However inactivated RVF vaccines need a booster 3–6 months following  
527 initial vaccination, followed by yearly boosters. Inactivated RVF vaccine is also used in outbreak situations, and  
528 in pregnant animals as the attenuated Smithburn vaccine is not suitable for this group.

529 • *Inactivated experimental human vaccine* formerly produced by the Salk Institute (USA) is no longer available  
530 (Meadors, 1986).

531 Many other candidate vaccines are either being developed and evaluated in target animals or are in early stage of  
532 development (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2011).

533 There are a number of product characteristics that it would be preferable to have in an effective and safe RVF  
534 vaccine, and that should be used to define a target product profile. Elements of a target product profile for a RVF  
535 vaccine should preferably meet recommendation 2 of the report of the FAO meeting, 2011 (FAO, 2011) and as  
536 indicated below.

537 The main purpose of a RVF vaccine is to prevent epizootics and epidemics in species of economic interest  
538 (susceptible livestock species [ruminants] and, potentially, camelids), and limit the impact on animal and public  
539 health. In addition to the potential economic impact, it could also have some implications in international movements  
540 of animals. It is relevant to distinguish specific requirements for endemic regions and regions free of the disease.

541 *Endemic region:* the objective is the prevention and control of epizootics and epidemics in endemic areas and to  
542 contribute to the improvement of livestock production in endemic areas. In order of priorities, characteristics of the  
543 vaccines are:

- 544 • preferably one dose, resulting in a long-lasting immunity;
- 545 • preferably a life-long immunity after a limited number of doses.

546 *Free or non-endemic region:* vaccines would be used either for the prevention of, or the response to an introduction  
 547 of the virus. The expected characteristics of the vaccines are: safe with a quick onset of protective immunity and  
 548 protection in animals of all ages and physiological status. Although DIVA (detection of infection in vaccinated  
 549 animals) is an important property of any future vaccine, a requirement for DIVA should not hinder or block the  
 550 development or licensing of an effective RVF vaccine.

551 In all the cases, the vaccines should be:

- 552 • Safe for the staff involved in the production of the vaccines and for the users, safe to all physiological stages of  
 553 animals, and with minimal risk of introduction into the environment (potential vectors);
- 554 • Protective in multi species and if possible in all susceptible species of economic importance, to prevent  
 555 infection and transmission;
- 556 • Cost effective for producers and users preferentially with a single-dose vaccination;
- 557 • Easy to use (e.g. preferably needle-free delivery), suitable for stockpiling (vaccine bank) and quick availability.

558 Staff handling virulent RVFV should preferably work in high containment facilities and be vaccinated, if vaccines are  
 559 available, to minimise the risk of infection.

560 Guidelines for the production of veterinary vaccines are given in Chapter 1.1.6 *Principles of veterinary vaccine*  
 561 *production*. The guidelines given below and in Chapter 1.1.6 are intended to be general in nature and may be  
 562 supplemented by national and regional requirements.

563 In the following description of vaccine production, information is given on live vaccine production adjacent to  
 564 information on inactivated vaccine production.

## 565 2. Outline of production and minimum requirements for conventional vaccines

### 566 a) Characteristics of the seed virus

#### 567 i) *Biological characteristics of the master seed virus*

568 The exact source of the isolate should be recorded and should include the type of material from which the virus  
 569 was derived. The *in-vitro* passage history of the virus and details of the ingredients should be recorded in  
 570 accordance with Chapter 1.1.6 of this *Terrestrial Manual*. The master seed virus (MSV) should be tested for  
 571 identity, purity (freedom from adventitious agents) and safety. Characterisation of the MSV should be done  
 572 using biological or genetic parameters as relevant.

573 Assuming adequate immunogenicity and for obvious safety reasons, it is highly recommended that attenuated  
 574 virus strains be used for the production of inactivated vaccines.

575 The number of virus passages from the MSV stock to the final product should not exceed five (European  
 576 Pharmacopoeia, 2012).

#### 577 ii) *Quality criteria*

578 The purity of the MSV and cells to be used for vaccine production must be maintained during the process. The  
 579 seed virus should be free from adventitious agents, bacteria and *Mycoplasma*, using tests known to be  
 580 sensitive for detection of these microorganisms (see Chapter 1.1.7 *Tests for sterility and freedom from*  
 581 *contamination of biological materials*). The aliquot to be tested should be representative of a titre adequate for  
 582 vaccine production, but not such a high titre that hyperimmune antisera are unable to neutralise seed virus  
 583 during purity testing. Seed virus is neutralised with monospecific antiserum or monoclonal antibody against a  
 584 RVFV different from the seed virus and the virus/antibody mixture is cultured on several types of cell line  
 585 monolayers. Neutralised cultures should be passaged and tested for adventitious viruses that may have  
 586 infected the cells or virus seed during previous passages. As an example, Bovine viral diarrhoea virus (BVDV)  
 587 is a potential contaminant introduced through the use of fetal bovine serum in cell culture systems. A cell line  
 588 highly permissive for BVDV types 1 and 2 is recommended as one of the cell lines chosen for evaluation of the  
 589 MSV. Products of bovine origin should be obtained from countries with negligible bovine spongiform  
 590 encephalopathy (BSE) risk.

#### 591 iii) *Validation as a vaccine strain*

592 The vaccine derived from the MSV must be shown to be satisfactory with respect to safety and efficacy for the  
 593 species for which it is intended.

594 **b) Method of manufacture**595 i) *Procedure*596 *Live vaccines*

597 Virus seed is produced in cell culture. Selection of a cell type for culture is dependent on the degree of virus  
598 adaptation, growth in medium, and viral yield in the specific culture system. Vaccine products should be limited  
599 to the number of passages from the MSV and should be restricted to five. Generally, large-scale monolayer or  
600 suspension cell systems are operated under strict temperature-controlled, aseptic conditions and defined  
601 production methods, to assure lot-to-lot consistency. Dose of virus used to inoculate cell culture should be kept  
602 to a minimum to reduce the potential for viral defective interfering particles. When the virus has reached its  
603 appropriate titre, as determined by CPE or other approved technique, the harvest can be clarified. Generally,  
604 the vaccine is freeze-dried, preferably in the presence of a suitable stabiliser.

605 *Inactivated vaccines*

606 Antigens used in inactivated vaccines are generally prepared in a similar way to live vaccines. The virus  
607 present in the virus maintenance medium is inactivated using a validated inactivation method then can be  
608 eventually concentrated/purified and formulated with a suitable adjuvant.

609 In the case where a virulent RVFV is used for inactivated vaccine production, staff handling the live virus  
610 should be vaccinated if vaccines are available and the facilities and practices should conform with high  
611 containment level minimising the risk of infection of the staff and release into the environment.

612 ii) *Requirements for ingredients*

613 Cell lines used for cell culture should be demonstrated free of extraneous agents. All animal origin products  
614 used in the production and maintenance of cells (i.e. trypsin, fetal bovine sera) and growth of virus should be  
615 free of extraneous agents, with special attention paid to the presence of BVDV.

616 iii) *In-process controls*

617 Yield can be assessed using antigenic mass or infectivity assays. Sterility of antigens should be checked  
618 throughout the process.

619 A validated inactivation control method is used to assure complete inactivation of the bulk material of each  
620 batch. For inactivated vaccines, samples taken at regular timed intervals during inactivation, then inoculated  
621 into a susceptible cell line (as used for production), should indicate a complete loss of titre by 2/3 of the total  
622 duration of the inactivation process.

623 For tests in cell cultures, not less than 150 cm<sup>2</sup> of cell culture monolayer is inoculated with 1.0 ml of inactivated  
624 harvest. The product complies with the test if no evidence of the presence of any live virus or other micro-  
625 organism is observed.

626 At the end of the production, antigen content is measured to establish that minimum bulk titres or antigenic  
627 mass have been achieved.

628 iv) *Final product batch tests*629 *Sterility*

630 The final products should be tested for absence of bacteria, *Mycoplasma* and fungal contamination (see  
631 chapter 1.1.7).

632 *Identity*

633 The bulk live attenuated virus or the inactivated antigen as well as the final formulated product (freeze-dried or  
634 liquid) should undergo identity testing before release to demonstrate that the relevant RVF strain is present.

635 *Safety*

636 Unless consistent safety of the product is demonstrated and approved in a registration dossier and the  
637 production process is approved for consistency in accordance with the standard requirements referred to in  
638 Chapter 1.1.6 of this *Terrestrial Manual*, batch safety testing is to be performed. The final product batch safety  
639 test is designed to detect any abnormal local or systemic adverse reactions.

640 If batch safety testing needs to be performed, each of at least two healthy sero-negative target animals have to  
 641 be inoculated by the recommended route of administration with the recommended dose of vaccine. The  
 642 animals are observed for local and systemic reactions to vaccination for no fewer than 14 days. Any undue  
 643 reaction attributable to the vaccine should be assessed and may prevent acceptance of the batch. If the  
 644 potency test is performed in the target species, observation of the safety during this test can also be considered  
 645 as an alternative to the batch safety test described here.

646 *Batch potency*

647 For live vaccines, potency is usually based on live virus titre. For batch release of inactivated vaccines, indirect  
 648 tests can be used for practicability and animal welfare considerations, as long as correlation has been validated  
 649 to the percentage of protection in the target animal. Frequently indirect potency tests include antibody titration  
 650 after vaccination of suitable species. Alternative methods (antigen mass) could be used if suitably validated.

651 *Moisture content*

652 The moisture content of the lyophilised attenuated vaccine should not exceed 5%.

653 **c) Requirements for authorisation/registration/licensing**

654 i) *Manufacturing process*

655 For registration of vaccine, all relevant details concerning manufacture of the vaccine and quality control testing  
 656 (see Section C.2.b.i to iv of this chapter) should be submitted to the Regulatory Authorities. This information  
 657 shall be provided from three consecutive vaccine batches with a volume not less than 1/3 of the typical  
 658 industrial batch volume.

659 The *in-process* controls are part of the manufacturing process.

660 ii) *Safety requirements*

661 For the purpose of gaining regulatory approval, the following safety tests should be performed satisfactorily. In  
 662 addition of these tests, the vaccines should be tested for safety in the field (see Chapter 1.1.6 on field tests  
 663 [safety and efficacy]).

664 *Live vaccines*

665 Vaccines should be tested for any pathogenic effects in each of the target species claimed on the label.

666 • *Safety test (overdose) in young animals*

667 Carry out the test for each recommended route of application using in each young target animal not older  
 668 than the minimum age recommended for vaccination. Use vaccine virus at the least attenuated passage  
 669 level that will be present in a batch of the vaccine.

670 Use not fewer than 8 healthy young target animals without antibodies against RVFV. Administer to each  
 671 animal a quantity of the vaccine virus equivalent to not less than 10 times the maximum virus titre likely to  
 672 be contained in 1 dose of the vaccine. Observe the animals daily for at least 14 days. The body  
 673 temperature of each vaccinated animal is measured on at least the 3 days preceding administration of the  
 674 vaccine, at the time of administration, 4 hours after and then daily for at least 14 days. The vaccine  
 675 complies with the test if the average body temperature increase for all animals does not exceed 1.5°C, no  
 676 animal shows a temperature rise greater than 1.5°C for a period exceeding 3 consecutive days, and no  
 677 animal shows notable signs of disease or dies from causes attributable to the vaccine.

678 • *Safety test in pregnant animals*

679 Safety at different stages of gestation should be demonstrated if the product is to be used in pregnant  
 680 animals.

681 Carry out the test with vaccination by a recommended route using not fewer than 16 healthy animals of  
 682 the same age and origin and that do not have antibodies against RVFV: 8 in the first third of gestation and  
 683 8 in the second third (periods of time where the teratogenic risk of RVF is the highest [Botros, 2006;  
 684 Hunter, 2002]). Use vaccine virus at the least attenuated passage level that will be present in a batch of  
 685 the vaccine.

686 Administer to each group a quantity of the vaccine virus equivalent to not less than the maximum virus  
 687 titre likely to be contained in 1 dose of the vaccine. Clinical observation of animals is carried out daily until  
 688 parturition. Blood samples should be taken from newborn animals before ingestion of colostrum.

- 689 The test is invalid if the vaccinated animals do not seroconvert before parturition. The vaccine virus  
 690 complies with the test if no abnormalities in the gestation or in the animals are noted. No animal shows  
 691 notable signs of disease or dies from causes attributable to the vaccine.
- 692 Vaccine virus must not be present in blood samples from newborn animals.
- 693 • *Non-transmissibility*
- 694 This test should be performed in the most susceptible species which is sheep for RVF.
- 695 Keep together not fewer than 12 healthy lambs, at the minimum age recommended for vaccination and of  
 696 the same origin, and that do not have antibodies against RVFV. Use vaccine virus at the lowest passage  
 697 level that will be present between the MSV and a batch of the vaccine. Administer by a recommended  
 698 route to not fewer than 6 lambs a quantity of the vaccine virus equivalent to not less than the maximum  
 699 virus titre likely to be contained in 1 dose of the vaccine.
- 700 Maintain not fewer than 6 lambs as contact controls. The mixing of vaccinated lambs and contact lambs is  
 701 done 24 hours after vaccination.
- 702 After 45 days, euthanise all lambs. Carry out appropriate tests on the lambs to detect antibodies against  
 703 RVF virus and on the control lambs to detect RVFV in the spleen and liver. The vaccine complies with the  
 704 test if antibodies are found in all vaccinated lambs and if no antibodies and no virus are found in the  
 705 control lambs.
- 706 • *Reversion-to-virulence*
- 707 This test is carried out using the master seed lot. If the quantity of the master seed lot sufficient for  
 708 performing the test is not available, the lowest passage material used for the production that is available in  
 709 sufficient quantity may be used. At the time of inoculation, the animals in all groups are of an age suitable  
 710 for recovery of the strain. Serial passages are carried out in target animals using five groups of animals,  
 711 unless there is justification to carry out more passages or unless the strain disappears from the test  
 712 animal sooner. In vitro propagation may not be used to expand the passage inoculum.
- 713 The passages are carried out using animals most appropriate to the potential risk being assessed.
- 714 The initial administration is carried out using the recommended route of administration most likely to lead  
 715 to reversion to virulence, using an initial inoculum containing the maximum release titre. After this, not  
 716 fewer than four further serial passages through animals of the target species are undertaken. The  
 717 passages are undertaken by the route of administration most likely to lead to reversion to virulence. If the  
 718 properties of the strain allow sequential passage via natural spreading, this method may be used,  
 719 otherwise passage of the virus is carried out and the virus that have been recovered at the final passage  
 720 are tested for increase in virulence. For the first four groups, a minimum of two animals is used. The last  
 721 group consists of a minimum of eight animals. At each passage, the presence of living vaccine-derived  
 722 virus in the material used for passage is demonstrated. Care must be taken to avoid contamination by  
 723 virus from previous passages. When the virus is not recovered from any intermediate in vivo passage,  
 724 repeat the passage in ten animals using in vivo passaged material from the last passage in which the  
 725 virus was recovered. The virus recovered is used as the inoculum for the next passage. If the vaccine  
 726 virus is not recovered, the experiment is considered to be completed with the conclusion that the vaccine  
 727 virus does not show an increase in virulence.
- 728 General clinical observations are made during the study. Animals in the last group are observed for  
 729 21 days unless otherwise justified. These observations include all relevant parameters typical for the  
 730 disease that could indicate increase in virulence. Compare the clinical signs and other relevant  
 731 parameters with those observed in the animals used in the test for safety of the administration of 1 dose. If  
 732 the last group of animals shows no evidence of an increase in virulence, further testing is not required.  
 733 Otherwise, material used for the first passage and the virus recovered at the final passage level are used  
 734 in a separate experiment using at least eight animals per group, to compare directly the clinical signs and  
 735 other relevant parameters. This study is carried out using the route of administration that was used for  
 736 previous passages. An alternative route of administration may be used if justified.
- 737 Unless otherwise justified and authorised, the product complies with the test if no animal dies or shows  
 738 signs attributable to the vaccine strain and no indication of increased virulence is observed in the animals  
 739 of the last group.
- 740 • *Environmental considerations*
- 741 A risk assessment should be prepared where potential spread or risk of live vaccines to non-target  
 742 species or spread by vector is considered.
- 743 • *Precautions (hazards)*
- 744 Modified live virus vaccines may pose a hazard to the vaccinator depending on the strain and level of  
 745 attenuation of the virus. Manufacturers should provide adequate warnings that medical advice should be  
 746 sought in case of self-injection of vaccine.

747 *Inactivated vaccines*748 • *Safety test (of one dose and a repeated dose)*

749 For the purposes of gaining regulatory approval, a trial batch of inactivated vaccine should be tested for  
 750 local and systemic safety by each recommended route of administration in an *in-vivo* test in eight animals  
 751 of each target species. Single dose and repeat dose tests using vaccines formulated to contain the  
 752 maximum permitted payload should be conducted. The repeat dose test should correspond to the primary  
 753 vaccination schedule (e.g. two injections) plus the first revaccination (i.e. a total of three injections). The  
 754 animals are observed for local and systemic reactions to vaccination for no fewer than 14 days after each  
 755 injection. Any undue reaction attributable to the vaccine should be assessed and may prevent acceptance  
 756 of the vaccine.

757 • *Safety test in pregnant animals*

758 Safety at different stages of gestation should be demonstrated if the product is to be used in pregnant  
 759 animals.

760 Carry out the test with vaccination by a recommended route using not fewer than 16 healthy animals of  
 761 the same age and origin and without antibodies against RVFV: 8 in the first third of gestation and 8 in the  
 762 second third.

763 Administer to each group a quantity of the vaccine equivalent to not less than the maximum antigen mass  
 764 likely to be contained in 1 dose of the vaccine. Clinical observation of animals is carried out daily until  
 765 parturition.

766 The test is invalid if the vaccinated animals do not seroconvert before parturition. The vaccine complies  
 767 with the test if no abnormalities in the gestation or in the animals are noted. No animal shows notable  
 768 signs of disease or dies from causes attributable to the vaccine.

769 • *Precautions (hazards)*

770 Inactivated RVFV vaccines present no danger to vaccinators, although accidental inoculation may result  
 771 in an adverse reaction caused by the adjuvant and secondary components of the vaccine. Manufacturers  
 772 should provide adequate warnings that medical advice should be sought in case of self-injection of  
 773 vaccine.

774 iii) *Efficacy requirements*

775 Vaccine efficacy is estimated in vaccinated animals directly by evaluating their resistance to live virus  
 776 challenge. In general, a successful test in lamb is considered to be sufficient evidence of the quality of a  
 777 vaccine to endorse its use in other species. Under circumstances where a vaccine is produced for use primarily  
 778 in a species other than lamb, it may be more appropriate to test the efficacy of the vaccine in that same  
 779 species. However, except for cattle, efficacy tests in other target species, such as goats or camelids have not  
 780 been developed yet.

781 • *Immunogenicity test in young animals*

782 The following test is applicable to sheep. For other species, appropriate modifications could be made.

783 A test is carried out for each route and method of administration recommended for vaccination using in  
 784 each case lambs of the minimum age to be recommended. The quantity of vaccine to be administered to  
 785 each lamb for a live vaccine is not greater than the minimum virus titre to be stated on the label and the  
 786 virus is at the most attenuated passage level that will be present in a batch of vaccine. For inactivated  
 787 vaccines, a minimum antigenic dose should be used according to the recommended vaccination  
 788 schedule.

789 Use for the test not fewer than 16 lambs without antibodies against RVF.

790 For live vaccine, collect sera from the lambs before vaccination, 7 days and 14 days after vaccination and  
 791 just before challenge. For inactivated vaccine, collect sera from the lambs before the first and second  
 792 injection of the primo vaccination and at the time of the challenge.

793 Vaccinate not fewer than 8 lambs, according to the recommended schedule. Maintain not fewer than eight  
 794 lambs as controls. For live vaccines, challenge each lamb after 20–22 days by an appropriate route with a  
 795 virulent RVFV. In case of inactivated vaccines, challenge each lamb 14 days after completion of primo  
 796 vaccination. Observe the lambs at least daily for 14 days after challenge and monitor for clinical signs and  
 797 viral load by virus isolation and qRT-PCR in blood.

798 The test is invalid if antibodies against RVFV in the sera of the control animals indicate that there was  
 799 intercurrent infection with the virus during the test.

800 The vaccine complies with the test if, during the observation period after challenge, in vaccinated lambs  
801 compared to controls there is a significant reduction in duration and titre of viraemia, and a notable  
802 reduction in clinical signs (if the challenge virus used produces such signs).

803 • *Immunogenicity test in pregnant animals*

804 The following test is applicable to sheep. For other species, appropriate modifications should be made,  
805 e.g. the most sensitive gestation period for challenge.

806 Use 16 ewes without antibodies against RVFV, randomly allocated to either the vaccine group (n = 8) or  
807 the control group (n = 8).

808 A test should be carried out for each of the recommended routes and methods of administration. The  
809 vaccine administered to each ewe is of minimum potency.

810 Vaccinate ewes free from RVFV and without antibodies against RVFV, before pregnancy, according to the  
811 recommended schedule. Use for the test not fewer than 16 pregnant ewes (eight vaccinated and eight  
812 controls). Keep all the animals as one group. Take a blood sample from non-vaccinated animals shortly  
813 before challenge. Challenge each animal between the 40<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> days of gestation. Two test models  
814 for the challenge may be performed with a sufficient quantity of virulent RVFV (observation until lambing  
815 or harvest of fetuses at 28 days). Observe the animals clinically at least daily from challenge, and either  
816 until the end of gestation or until harvest of fetuses after 28 days. If abortion occurs, examine the aborted  
817 fetus for the presence of the RVFV. If animals are observed until lambing, immediately after birth and prior  
818 to ingestion of colostrum, examine all lambs for viraemia and antibodies against RVFV. If fetuses are  
819 harvested 28 days after challenge, examine the fetuses for RVFV by suitable methods. Transplacental  
820 infection is considered to have occurred if virus is detected in fetal organs or in the blood of newborn  
821 lambs or if antibodies are detected in precolostral sera of lambs.

822 The test is invalid if any of the control animals have neutralising antibody before challenge. The test  
823 should show significant difference in protection and transplacental transmission between the vaccinated  
824 and control groups of animals.

825 iv) *Vaccines permitting a DIVA strategy (detection of infection in vaccinated animals)*

826 There is currently no DIVA strategy available for the existing RVF vaccines.

827 v) *Duration of immunity*

828 As part of the authorisation procedure the manufacturer should demonstrate the duration of immunity of a given  
829 vaccine by either challenge or the use of a validated alternative test, such as serology at the end of the claimed  
830 period of protection.

831 vi) *Stability*

832 The stability of all vaccines should be demonstrated as part of the shelf-life determination studies for  
833 authorisation.

834 The period of validity of a batch of lyophilised RVF vaccine or a batch of liquid inactivated vaccine should not  
835 be less than 1 year.

836 **REFERENCES**

837 AFETINE J.M., TIJHAAR E., PAWESKA J.T., NEVES L.C., HENDRIKS J., SWANEPOEL R., COETZER J.A., EGBERINK H.F. &  
838 RUTTEN V.P. (2007). Cloning and expression of Rift Valley fever virus nucleocapsid (N) protein and evaluation of an  
839 N-protein based indirect ELISA for the detection of specific IgG and IgM antibodies in domestic ruminants. *Vet.*  
840 *Microbiol.*, **31**, 29–38.

841 BARNARD B.J.H. (1979). Rift Valley fever vaccine – antibody and immune response in cattle to a live and an  
842 inactivated vaccine. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **50**, 155–157.

843 BARNARD B.J.H. & BOTHA M.J. (1977). An inactivated Rift Valley fever vaccine. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **48**, 45–48.

844 4. ~~BARNARD B.J.H. & VOGES S.F. (1986). Flaviviruses in South Africa: Diagnostic procedures. *Onderstepoort J.*  
845 *Vet. Res.*, **53**, 181–185.~~

846 BIRD B.H., KHRISTOVA M.L., ROLLIN P.E. & NICHOL S.T. (2007). Complete genome analysis of 33 ecologically and  
847 biologically diverse Rift Valley fever virus strains reveals widespread virus movement and low genetic diversity due  
848 to recent common ancestry. *J. Virol.*, **81**, 2805–2816.

- 849 BOTROS B., OMAR A., ELIAN K., MOHAMED G., SOLIMAN A., SALIB A., SALMAN D., SAAD M. & EARHART K. (2006). Adverse  
850 response of non-indigenous cattle of European breeds to live attenuated Smithburn Rift Valley fever vaccine. *J. Med.*  
851 *Virol.*, **78**, 787–791.
- 852 CETTRE-SOSSAH C., BILLECOQ A., LANCELOT R., DEFERNEZ C., FAVRE J., BOULOY M., MARTINEZ D. & ALBINA E. (2009).  
853 Evaluation of a commercial competitive ELISA for the detection of antibodies to Rift Valley fever virus in sera of  
854 domestic ruminants in France. *Prev. Vet. Med.*, **90**, 146–149.
- 855 7. — CLARKE D.H. & CASALS J. (1958). Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with  
856 arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **7**, 561–573.
- 857 COACKLEY W., PINI A. & GOSDIN D. (1967). Experimental infection of cattle with pantropic Rift Valley fever virus. *Res.*  
858 *Vet. Sci.*, **8**, 399–405.
- 859 COETZER J.A.W. (1982). The pathology of Rift Valley fever. 11. Lesions occurring in field cases in adult cattle, calves  
860 and aborted fetuses. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **49**, 11–17.
- 861 COETZER J.A.W. & BARNARD B.J.H. (1977). *Hydrops amnii* in sheep associated with hydranencephaly and  
862 arthrogyposis with Wesselsbron disease and Rift Valley fever viruses as ethological agents. *Onderstepoort J. Vet.*  
863 *Res.*, **44**, 119–126.
- 864 DIGOUTTE J.P., JOUAN A., LEGUENNO B., RIOU O., PHILIPPE B., MEEGAN J.M., KSIAZEK T.G. & PETERS C.J. (1989).  
865 Isolation of the Rift Valley fever virus by inoculation into *Aedes pseudoscutellaris* cells: comparison with other  
866 diagnostic methods. *Res. Virol.*, **140**, 31–41.
- 867 DROSTEN C., GOTTIG S., SCHILLING S., ASPER M., PANNING M., SCHMITZ H. & GUNTHER S. (2002). Rapid detection and  
868 quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean–Congo hemorrhagic fever virus, Rift  
869 Valley fever virus, Dengue virus, and Yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*,  
870 **40**, 2323–2330.
- 871 DUNGU B., LOUW I., LUBISI A., HUNTER P., VON TEICHMAN B.F. & BOULOY M. (2010). Evaluation of the efficacy and safety  
872 of the Rift Valley fever clone 13 vaccine in sheep. *Vaccine*, **28**, 4581–4587.
- 873 EASTERDAY B.C. (1965). Rift Valley fever. *Adv. Vet. Sci.*, **10**, 65–127.
- 874 EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2012). Version 7.5. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France.
- 875 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2011). Rift Valley fever vaccine development,  
876 progress and constraints. Proceedings of the GF-TADs meeting, Rome, Italy, FAO Animal Production and Health  
877 Proceedings, No 12.
- 878 GARCIA S., CRANCE J.M., BILLECOQ A., PEINNEQUIN A., JOUAN A., BOULOY M. & GARIN D. (2001). Quantitative real-time  
879 PCR detection of Rift Valley fever virus and its application to evaluation of antiviral compounds. *J. Clin. Microbiol.*,  
880 **39**, 4456–4461.
- 881 GENTSCH J.R. & BISHOP D.L. (1979). M viral RNA segment of bunyaviruses codes for two glycoproteins, G1 and G2.  
882 *J. Virol.*, **9**, 767–770.
- 883 GERDES G.H. (2004). Rift Valley fever. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **23**(2), 613–623.
- 884 14. — HUBBARD K.A., BASKERVILLE A. & STEPHENSON J.R. (1991). Ability of a mutagenised virus variant to protect  
885 young lambs from Rift Valley fever. *Am. J. Vet. Res.*, **52**, 50–55.
- 886 GIORGI C., ACCARDI L., NICOLETTI L., GRO M.C., TAKEHARA K., HILDITCH C., MORIKAWA S. & BISHOP D.H. (1991).  
887 Sequences and coding strategies of the S RNAs of Toscana and Rift Valley fever viruses compared to those of  
888 Punta Toro, Sicilian Sandfly fever, and Uukuniemi viruses. *Virology*, **180** (2), 738–573.
- 889 HUNTER P. & BOULOY M. (2001). Investigation of C13 RVF mutant as a vaccine strain. Proceedings of 5<sup>th</sup>  
890 International sheep veterinary congress, 21–25 January 2001, Stellenbosch, South Africa. University of Pretoria,  
891 South Africa.
- 892 HUNTER P., ERASMUS B.J. & VORSTER J.H. (2002). Teratogenicity of a mutagenised Rift Valley fever virus (MVP 12) in  
893 sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **69**, 95–98.
- 894 JACOBSON R.H. (1998). Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev. sci. tech. Off. int.*  
895 *Epiz.*, **17**, 469–486.



- 896 JANSSEN VAN VUREN P., POTGIETER A.C., PAWESKA J.T. & VAN DIJK A.A. (2007). Preparation and evaluation of a  
897 recombinant Rift Valley fever virus N protein for the detection of IgG and IgM antibodies in humans and animals by  
898 indirect ELISA. *J. Virol. Methods*, **140**, 106–114.
- 899 JUPP P.G., GROBBELAAR A.A., LEMAN P.A., KEMP A., DUNTON R.F., BURKOT T.R., KSIAZEK T.G. & SWANEPOEL R. (2000).  
900 Experimental detection of Rift Valley fever virus by reverse transcription-polymerase chain reaction assay in large  
901 samples of mosquitoes. *J. Med. Entomol.*, **37**(3), 467–471.
- 902 LE ROUX C.A., KUBO T., GROBBELAAR A.A., VAN VUREN P.J., WEYER J., NEL L.H., SWANEPOEL R., MORITA K. & PAWESKA  
903 J.T. (2009). Development and evaluation of a real time reverse transcription-loop mediated isothermal amplification  
904 assay for rapid detection of Rift Valley fever virus in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 645–651.
- 905 LINTHICUM KENNETH J., DAVIES F.G., KAIRO A. & BAILEY C.L. (1985). Rift Valley fever virus (family Bunyaviridae, genus  
906 *Phlebovirus*). Isolations from *Diptera* collected during an inter-epizootic period in Kenya. *J. Hygiene*, **95** (1), 197–  
907 209.
- 908 MADANI T.A., AL-MAZROU Y.Y., AL-JEFFERI M.H., MISHKHAAS A.A., AL-RABEAH A.M., TURKISTANI A.M., AL-SAYED M.O.,  
909 ABODAHISH A.A., KHAN A.S., KSIAZEK T.G. & SHOBOKSHI O. (2003). Rift Valley fever epidemic in Saudi Arabia:  
910 epidemiological, clinical, and laboratory characteristics. *Clin. Infect. Dis.*, **37**, 1084–1092.
- 911 MCINTOSH B.M., RUSSEL D., DOS SANTOS I. & GEAR J.H.S. (1980). Rift Valley fever in humans in South Africa. *S. Afr.*  
912 *Med. J.*, **58**, 803–806.
- 913 MEADORS G.F., GIBBS P.H., & PETERS C.J. (1986). Evaluations of a new Rift Valley fever vaccine: Safety and  
914 immunogenicity trials. *Vaccine*, **4**, 179–184.
- 915 MEEGAN J.M. (1981). Rift Valley fever in Egypt: An overview of the epizootics in 1977 and 1978. *Contrib. Epidemiol.*  
916 *Biostat.*, **3**, 100–103.
- 917 MEEGAN J.M. & BAILEY C.L. (1989). Rift Valley fever. In: The Arboviruses: Epidemiology and Ecology, Vol. IV, Monath  
918 T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 52–76.
- 919 23. MORRILL J.C., JENNINGS G.B., CAPLAN H., TURREL M.J., JOHNSON A.J. & PETERS C.J. (1987). Pathogenicity and  
920 immunogenicity of a mutagen attenuated Rift Valley fever virus immunogen in pregnant ewes. *Am. J. Vet. Res.*,  
921 **48**, 1042–1047.
- 922 24. MORRILL J.C., MEBUS C.A. & PETERS C.J. (1997). Safety and efficacy of a mutagen-attenuated Rift Valley fever  
923 virus vaccine in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 1104–1109.
- 924 25. MORRILL J.C., MEBUS C.A. & PETERS C.J. (1997). Safety of a mutagen-attenuated Rift Valley fever virus vaccine  
925 in fetal and neonatal bovids. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 1110–1114.
- 926 MULLER R., SALUZZO J.F., LOPEZ N., DREIER T., TURRELL M., SMITH J. & BOULOY M. (1995). Characterization of clone 13  
927 – a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus which is altered in the small segment. *Am. J. Trop.*  
928 *Med. Hyg.*, **53**, 405–411.
- 929 MUNYUA P., MURITHI R.M., WAINWRIGHT S., GITHINJI J., HIGHTOWER A., MUTONGA D., MACHARIA J., ITHONDEKA P.M.,  
930 MUSAA J., BREIMAN R.F., BLOLAND P. & NJENGA M.K. (2010). Rift Valley fever outbreak in livestock in Kenya, 2006–  
931 2007. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **83**, 58–64.
- 932 NAKANE P.K. & AKIRA KAWAOI A. (1974). Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem.*  
933 *Cytochem.*, **22**, 1084–1091.
- 934 PAWESKA J.T., BURT F.J., ANTHONY F., SMITH S.J., GROBBELAAR A.A., CROFT J.E., KSIAZEK T.G. & SWANEPOEL R. (2003).  
935 IgG-sandwich and IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Rift Valley fever  
936 virus in domestic ruminants. *J. Virol. Methods*, **113** (2), 103–112.
- 937 PAWESKA J.T., MORTIMER E., LEMAN P.A. & SWANEPOEL R. (2005). An inhibition enzyme-linked immunosorbent assay  
938 for the detection of antibody to Rift Valley fever virus in humans, domestic and wild ruminants. *J. Virol. Methods*,  
939 **127**, 10–18.
- 940 29. SALL A.A., DE AZANOTTO P.M., ZELLER H.G., DIGOUTTE J.P., THIONGANE Y. & BOULOY M. (1997). Variability of the  
941 NS(S) protein among Rift Valley fever virus isolates. *J. Gen. Virol.*, **78**, 2853–2858.
- 942 SALL A.A., THONNON J., SENE O.K., FALL A., NDIAYE M., BAUDES B., MATHIOT C. & BOULOY M. (2001). Single-tube and  
943 nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of Rift Valley fever virus in human and  
944 animal sera. *J. Virol. Methods*, **91**, 85–92.

- 945 SMITHBURN K.C. (1949). Rift Valley fever; the neurotropic adaptation of the virus and the experimental use of this  
946 modified virus as a vaccine. *Br. J. Exp.*, **30**, 1–16.
- 947 SWANEPOEL R. & COETZER J.A.W. (1994). Rift Valley fever. *In: Infectious Diseases of Livestock with Special*  
948 *Reference to Southern Africa*. Vol. 1, Coetzer J.A.W., Thomson G.R. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press,  
949 UK.
- 950 SWANEPOEL R., STUTHERS J.K., ERASMUS M.J., SHEPHERD S.P., MCGILLIVRAY G.M., SHEPHERD A.J., ERASMUS B.J. &  
951 BARNARD B.J.H. (1986). Comparative pathogenicity and antigenic cross-reactivity of Rift Valley fever and other  
952 African phleboviruses in sheep. *J. Hyg. (Camb.)*, **97**, 331–346.
- 953 VAN VUREN P.J. & PAWESKA J.T. (2010). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay-based techniques for  
954 the detection of antibody to Rift Valley fever virus in thermochemically inactivated sheep sera. *Vect. Born. Zoon.*  
955 *Dis.*, **10**, 697–699.
- 956 WEISS K.E. (1957). Rift Valley fever – a review. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, **5**, 431–458.
- 957 WILLIAMS R., ELLIS C.E., SMITH S.J., POTGIETER C.A., WALLACE D., MARELEDWANE V.E. & MAJIWA P.A. (2011). Validation  
958 of an IgM antibody capture ELISA based on a recombinant nucleoprotein for identification of domestic ruminants  
959 infected with Rift Valley fever virus. *J Virol Methods*, **177** (2), 140–146.

960  
961

\*  
\* \*

962 **NB:** There are OIE Reference Laboratories for Rift Valley fever  
963 (see Table in Part 4 of this *Terrestrial Manual* or consult the OIE Web site for the most up-to-date list:  
964 <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/> ).  
965 Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on  
966 diagnostic tests, reagents and vaccines for Rift Valley fever

**GRUPO AD HOC DE INTERCAMBIO DE IDEAS SOBRE LOS NUEVOS ENFOQUES DE DIAGNÓSTICO:  
GENÓMICA APLICADA****Paris (Sede de la OIE), 10–12 de diciembre de 2012**

Del 10 al 12 de diciembre de 2012, en la sede de la OIE, se convocó un Grupo de intercambio de ideas sobre los nuevos enfoques de diagnóstico, en este caso, la genómica aplicada. La Dra. Elisabeth Erlacher-Vindel, jefa adjunta del departamento científico y técnico de la OIE, dio la bienvenida a los participantes en nombre del Dr. Bernard Vallat, director general de la OIE. Al Grupo se le encargó la tarea específica de asesorar a la OIE sobre la identificación de las oportunidades y los desafíos que representa la secuenciación con tecnologías de alto rendimiento (HTS, por su siglas en inglés) y la genómica computacional, y de emplear todo su potencial en el contexto de la sanidad animal.

El temario y la lista de participantes figuran, respectivamente, en el [Anexo I](#) y [II](#).

**1. Introducción**

En los últimos años, los enfoques de diagnóstico que recurren a la secuenciación con tecnologías de alto rendimiento, la bioinformática y la genómica computacional han acarreado una profunda transformación en el área de la investigación médica. Aún más, estas novedosas tecnologías han sentado las bases de nuevos métodos de alto potencial en materia de diagnóstico, vigilancia, control y notificación de enfermedades infecciosas.

A efectos de este informe, la secuenciación de alto rendimiento abarca una amplia variedad de métodos de secuenciación de ADN en los que se incluyen las plataformas de “secuenciación de última generación”, los secuenciadores de moléculas de ADN (secuenciación de tercera generación) y las nanotecnologías, actualmente en fase de desarrollo.

Si bien este informe no brinda una explicación detallada de los principios y las posibilidades de estas plataformas de secuenciación, el Libro blanco preparado por Belák *et al.* (*High-Throughput Sequencing in Veterinary Infection Biology and Diagnostics*) que se publicará próximamente en la *Revista técnica y científica* de la OIE las describe minuciosamente. La secuenciación de alto rendimiento permite la detección, la identificación y el análisis detallado tanto de los genomas patógenos como de los hospedadores a una escala, velocidad y profundidad sin precedentes. Inicialmente, la instrumentación necesaria para la secuenciación de alto rendimiento era extremadamente costosa y sólo estaba al alcance de los grandes centros de secuenciación e investigación. No obstante, en los últimos años, se han desarrollado nuevas metodologías y plataformas de secuenciación que han facilitado la utilización por parte de pequeños laboratorios de diagnóstico, e incluso directamente en el terreno. La secuenciación de alto rendimiento ofrece una variedad de aplicaciones potenciales para el diagnóstico, la vigilancia y el control de enfermedades infecciosas.

La cantidad de información generada por la secuenciación de alto rendimiento ha sido de una magnitud sin precedentes. En este informe, los términos ‘bioinformática y genómica computacional’ se aplican a nociones generales e incluyen el manejo, la recuperación y el análisis inicial de datos voluminosos, además de un análisis computacional posterior efectuado, con el fin de investigar la estructura, las características y las relaciones de todas las secuencias genómicas (sea del ARN o del ADN). Por lo tanto, el potencial completo de la secuenciación de alto rendimiento no se puede alcanzar sin recurrir a la bioinformática y la genómica computacional (BCG, por sus siglas en inglés). En el presente informe, se utiliza la abreviación ‘HTS-BCG’ para definir la totalidad del proceso, desde la colecta de muestras y la preparación de la secuenciación, hasta el posterior análisis computacional.

El Grupo destacó que, en el contexto de la sanidad animal, cualquier centro de investigación y diagnóstico que desee explotar el potencial completo de la HTS-BCG necesita contar con personal competente. Se han de completar las competencias clásicas en materia de manejo y diagnóstico de casos veterinarios, sistemas de gestión de información de laboratorio, biología molecular e infección molecular con pericia en bioinformática y genómica computacional.

## 2. Oportunidades

El Grupo subrayó que los nuevos avances en materia de HTS-BCG ofrecen diversas oportunidades para la sanidad animal y, más específicamente, el diagnóstico, la vigilancia y el control de enfermedades infecciosas animales. A continuación, se resumen algunas de sus principales aplicaciones:

- detección, identificación y caracterización de nuevos microorganismos;
- mejora del diagnóstico de enfermedades desconocidas;
- mejora del diagnóstico de enfermedades emergentes y reemergentes, con etiología conocida o no;
- posibilidad de desarrollar, a partir de enfoques de diagnóstico preestablecidos, pruebas de diagnóstico únicas e 'universales' capaces de identificar cualquier patógeno potencial;
- detección simultánea y rápida de múltiples agentes de enfermedad con una etiología multifactorial;
- mayor capacidad para estudiar la dinámica evolutiva de los patógenos en la granja, al igual que a nivel local, nacional y mundial;
- mayor comprensión de la epidemiología de las enfermedades infecciosas y de la filogeografía de los agentes infecciosos;
- trazabilidad reforzada de las enfermedades infecciosas y los modos de transmisión de patógenos, incluyendo aplicaciones en epidemiología forense;
- caracterización más amplia de las 'poblaciones' de patógenos conocidos (por ejemplo: cepas minoritarias importantes y cepas mutantes de escape) que, a su vez, facilitan la elaboración de mejores vacunas, antivirales, etc.;
- vínculos reforzados entre el genotipo de los patógenos y los fenotipos, gracias a la secuenciación completa del genoma de cepas múltiples (incluyendo cepas de referencia) de un agente único.

## 3. Desafíos

Como sucede en todo desarrollo científico revolucionario, el Grupo reconoció que la secuenciación HTS-BCG también se enfrenta a ciertos desafíos de interés:

- necesidad de optimizar el registro de los parámetros y el software utilizado para analizar las diferentes tecnologías de secuenciación de alto rendimiento;
- necesidad de mejorar y optimizar los enfoques para la preparación de las muestras de especímenes biológicamente apropiados para investigaciones veterinarias;
- necesidad de optimizar y estandarizar los sistemas y las infraestructuras para capturar, manejar, archivar y acceder a los datos de secuenciación de alto rendimiento;
- armonización cuidadosa de la interpretación de los datos de secuenciación de alto rendimiento en el contexto de la sanidad animal;
- necesidad de contar con personal competente en el campo de la bioinformática, no siempre disponible a nivel mundial, para servirse de todo el potencial de la secuenciación de alto rendimiento (por ejemplo, a través del desarrollo de redes de informática a medida para diferentes aplicaciones).

Existen otros retos que esperan a la OIE con el uso más amplio de las tecnologías HTS-BCG, quizá por parte de usuarios no tradicionales o no comprometidos de manera formal con investigaciones en el área de la sanidad animal:

- la detección continua y la rápida identificación de supuestos agentes infecciosos nuevos, sin pruebas rigurosas de su significado biológico para la enfermedad, representa un desafío para la OIE y para las organizaciones de sanidad animal;

- la necesidad de identificar y saber analizar las oportunidades de diagnóstico, vigilancia y control de enfermedades;
- la necesidad de desarrollar e incorporar en los *Manuales* de la OIE las normas para las plataformas de secuenciación de alto rendimiento, incluyendo la colecta y preparación de muestras, la gestión y el análisis de datos;
- la metodología HTS-BCG ha de ser validada en su totalidad y garantizar la calidad, con el fin de emplearse como herramienta de diagnóstico;
- las fuentes de orientación y asistencia (tanto las establecidas como las nuevas) relativas a la implementación de métodos HTS-BCG en el laboratorio han de identificarse y comunicarse a los Países Miembros;
- la evaluación de la viabilidad técnica de los datos de secuenciación de alto rendimiento (incluyendo datos en bruto y metadatos) que se incorporen en el Sistema mundial de información zoonosológica (WAHIS);
- el desarrollo de procedimientos de notificación y confirmación de resultados de secuenciación de alto rendimiento (incluyendo la identificación de supuestos patógenos nuevos);
- el estudio de los asuntos legales, entre ellos, los derechos de propiedad intelectual;
- la OIE no deberá recomendar plataformas comerciales específicas de secuenciación de alto rendimiento en un entorno en el que la mayoría de los sistemas operativos suelen conocerse por su denominación comercial.

#### 4. Recomendaciones a la OIE

La HTS-BCG ha revolucionado la investigación médica y se aplica en una gran diversidad de contextos científicos. La sanidad animal puede beneficiarse enormemente de los resultados que ofrecen estas nuevas tecnologías. Por lo tanto, el Grupo acordó que la OIE deberá brindar la orientación necesaria para adoptarlas con éxito cuando sea conveniente, y recomendó que la OIE:

- a) asuma un liderazgo mundial con miras a garantizar que todo el potencial de la HTS-BCG se aplique a la sanidad animal y la seguridad de los alimentos;
- b) desarrolle y adopte normas en los *Manuales* para el uso de HTS-BCG;
- c) reúna a un Grupo *ad hoc* con expertos en HTS-BCG, diagnóstico de laboratorio, investigación en epidemiología y enfermedades infecciosas, con el fin de:
  - i) identificar los asuntos de diagnóstico, vigilancia y control de enfermedades que pueden tratarse mediante HTS-BCG;
  - ii) recomendar enfoques normativos relativos a la armonización e interpretación de datos de secuenciación de alto rendimiento;
  - iii) asesorar a la OIE sobre las mejores prácticas frente a las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, incluyendo captura de datos y metadatos, manejo y notificación, así como de validación del método completo de diagnóstico HTS-BCG; y
  - iv) proponer criterios científicos rigurosos para la identificación de los agentes implicados en procesos patológicos provenientes de datos metagenómicos complejos (criterios nuevos o afinados para la causalidad de las enfermedades);
- d) identifique una red de expertos dentro de los Centros colaboradores y Laboratorios de referencia que, a través de la colecta de información existente, pueda ofrecer la pericia y formación apropiadas en el campo de la HTS-BCG;
- e) considere ampliar el mandato del Grupo *ad hoc* sobre la 'Validación' para que abarque la HTS-BCG;

- f) añada la funcionalidad necesaria al actual sistema WAHIS para que se incluya la secuencia del genoma del patógeno cuando esté disponible;
- g) evalúe la viabilidad (por medio de consultores internos y externos) de ampliar el actual sistema WAHIS con datos de secuenciación de alto rendimiento y elabore normas para el archivo y manejo de dichos datos, además de su consulta. La OIE ha de tener en cuenta las bases de datos similares desarrolladas por otras organizaciones internacionales;
- h) se asesore legalmente sobre los derechos de propiedad intelectual relativos a la secuenciación de alto rendimiento;
- i) solicite a sus Centros colaboradores la asesoría y orientación necesarias sobre los criterios de rendimiento útiles para identificar plataformas de secuenciación de alto rendimiento específicas que respondan a las necesidades de laboratorios individuales.

## 5. Conclusiones

En resumen, el Grupo concluyó que la HTS-BCG está teniendo un gran impacto en la comunidad científica biomédica y que su influencia aumentará de manera exponencial en el futuro. El costo de estas tecnologías seguirá disminuyendo y, al mismo tiempo, se observará un incremento colosal en la generación de información científica.

Entre los principales retos para el futuro, se destacan las capacidades necesarias a la hora de archivar, estructurar, manejar, analizar, recuperar e interpretar los datos. Asimismo, surgirá la necesidad apremiante de normas internacionales en relación con la gestión y validación de enfoques HTS-BCG en el sector del diagnóstico de enfermedades animales. De todas formas, la sanidad animal podría beneficiarse enormemente del potencial que ofrecen estas tecnologías.

---

.../Anexos

**GRUPO AD HOC DE INTERCAMBIO DE IDEAS SOBRE LOS NUEVOS ENFOQUES DE DIAGNÓSTICO:  
GENÓMICA APLICADA**

**Paris (Sede de la OIE), 10–12 de diciembre de 2012**

---

**Temario**

1. Introducción
2. Oportunidades
3. Desafíos
4. Recomendaciones a la OIE
5. Conclusiones

**GRUPO AD HOC DE INTERCAMBIO DE IDEAS SOBRE LOS NUEVOS ENFOQUES DE DIAGNÓSTICO:  
GENÓMICA APLICADA**

**Paris (Sede de la OIE), 10–12 de diciembre de 2012**

**Lista de participantes**

**MIEMBROS**

**Dr. Craig N. Carter**

(Chairman)

Director & Professor, Epidemiology  
Veterinary Diagnostic Laboratory  
Department of Veterinary Science  
College of Agriculture & Public Health  
University of Kentucky, 1490 Bull Lea  
Rd, Lexington, KY 40511

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Tel.: (1-859) 257.8283 (Office)  
(1-859) 321.4890 (Business cell)

[craig.carter@uky.edu](mailto:craig.carter@uky.edu)

**Dr. Sándor Belak**

Swedish University of Agricultural  
Sciences, Department of Biomedical  
Sciences and Veterinary Public Health  
P.O. Box 7036,  
750 07 Uppsala

SUECIA

Tel: (46-18) 67.41.35  
Fax: (46-18) 30.91.62

[sandor.belak@slu.se](mailto:sandor.belak@slu.se)

**Prof. Steven Edwards**

Consultor, Editor del *Manual Terrestre*,  
c/o OIE 12 rue de Prony

75017 París, FRANCIA

Tel.: (33-1) 44.15.18.88

Fax: (33-1) 42.67.09.87

[steve-oie@cabanas.waitrose.com](mailto:steve-oie@cabanas.waitrose.com)

**Prof. Vincenzo Caporale**

(President, OIE Biological Standards  
Commission),

Colleaterrato Alto, 64100 Teramo

ITALIA

Tel.: (39-348) 79.78.711 /

(39-0861) 210.900

[v.caporale@oie.int](mailto:v.caporale@oie.int)

[caporalevincenzo@gmail.com](mailto:caporalevincenzo@gmail.com)

**Prof. Massimo Palmarini**

(Ponente)

Director, MRC - University of Glasgow  
Centre for Virus Research and Professor of  
Virology, Institute of Infection, Immunity  
and Inflammation, College of Medical,  
Veterinary and Life Sciences, University of  
Glasgow, 464 Bearsden Road, Glasgow  
G61 1QH, Escocia,

REINO UNIDO

Tel.: (44-41) 330.2541 (or 4645)

[massimo.palmarini@glasgow.ac.uk](mailto:massimo.palmarini@glasgow.ac.uk)

**Dr. Peter Daniels**

(Miembro de la Comisión de Normas  
Biológicas)

Australian Animal Health Laboratory  
PMB 24, Geelong 3220 X

AUSTRALIA

Tel.: (61-3) 5227.5014

Fax: (61-3) 5227.5555

[peter.daniels@csiro.au](mailto:peter.daniels@csiro.au)

**Dr. Baptiste Dungu**

(Invitado pero no pudo asistir)

GALVmed (Global Alliance for  
Livestock Veterinary Medicines),  
Doherty Building, Pentlands Science  
Park, Bush Loan, Edinburgh EH26  
0PZ, Escocia

REINO UNIDO

Tel.: (44-131) 445.6198

Fax: (44-131) 445.6222

[Baptiste.Dungu@galvmed.org](mailto:Baptiste.Dungu@galvmed.org)

**OTRO PARTICIPANTE**

**Dra. Rossella Lelli**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
della Sicilia, Sede Centrale, Via  
G.Marinuzzi, 3, 90129 PALERMO  
ITALIA

Tel: (39-091) 656.5338 / 5220

Fax: (39-091) 657.0803

[rossella.elli@izssicilia.it](mailto:rossella.elli@izssicilia.it)

**SEDE DE LA OIE**

**Dr. Bernard Vallat**

Director general  
OIE 12 rue de Prony  
75017 París, FRANCIA  
Tel.: (33-1) 44.15.18.88  
Fax: (33-1) 42.67.09.87

[oie@oie.int](mailto:oie@oie.int)

**Dra. Elisabeth Erlacher-Vindel**

Jefa adjunta, Departamento científico y  
técnico

[e.erlacher-vindel@oie.int](mailto:e.erlacher-vindel@oie.int)

**Ms Sara Linnane**

Secretaria de redacción científica  
Departamento científico y técnico

[s.linnane@oie.int](mailto:s.linnane@oie.int)

**Dr. François Diaz**

Comisionado, Departamento  
científico y técnico

[f.diaz@oie.int](mailto:f.diaz@oie.int)



**INFORME DE LA REUNIÓN DEL GRUPO AD HOC DE LA OIE  
SOBRE LA VALIDACIÓN DE PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO EN LOS ANIMALES SILVESTRES  
París, 15 - 17 de enero de 2013**

---

La segunda reunión del Grupo *ad hoc* de la OIE sobre la validación de pruebas de diagnóstico en los animales silvestres (en lo sucesivo el Grupo) se celebró en la sede de la OIE, en París, Francia, del 15 al 17 de enero de 2013.

**1. Apertura**

La Dra. Elisabeth Erlacher-Vindel, Jefa adjunta del Departamento Científico y Técnico, dio la bienvenida a los participantes en la reunión en nombre del Dr. Bernard Vallat, Director General de la OIE. Seguidamente, presentó un breve informe de las actividades recientes de la OIE en relación con las pruebas de diagnóstico y la fauna silvestre, y le recordó al Grupo el procedimiento de elaboración de normas y directrices de la OIE.

**2. Designación del presidente y del relator**

La reunión fue presidida por el Prof. John Fischer, y la Prof. Anita L. Michel fue designada para redactar el informe.

**3. Aprobación del temario**

El Dr. Fischer presentó el temario provisional, que el Grupo aprobó como temario de la reunión. El temario y la lista de participantes se adjuntan como Anexos I y II, respectivamente.

**4. Finalización del proyecto de norma “Principios y métodos para la validación de pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas aplicables a los animales salvajes”**

Previamente a la discusión del proyecto de norma, se informó al Grupo de la reunión celebrada en agosto de 2012 por el Grupo *ad hoc* sobre la validación de ensayos de diagnóstico. El objetivo de dicha reunión había sido responder a los comentarios recibidos de los Países Miembros sobre la versión actualizada propuesta del Capítulo 1.1.5. del *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres (Manual Terrestre)*. El Prof. Ian Gardner, que había participado en aquella reunión, le presentó al Grupo los resultados y las principales modificaciones al capítulo sugeridas por dicho Grupo *ad hoc*.

El Grupo discutió el estado del documento en curso de elaboración “Principios y métodos para la validación de pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas aplicables a los animales salvajes” y concluyó que sería preferible incluirlo como un Anexo al Capítulo 1.1.5. del *Manual Terrestre*, con carácter de norma de la OIE, sujeto a su aprobación por los Países Miembros.

El Grupo inició su labor sobre el documento abordando las siguientes cuestiones pendientes según consta en el informe de su primera reunión:

- *Afinidad de las especies en relación con el tipo de prueba (pruebas directas frente a pruebas indirectas):* este punto se resolvió con la propuesta de inserción de un nuevo texto en el apartado 3 de la norma;
- *Influjo del tipo de prueba en el diagrama (¿contextos paralelos con modificaciones necesarias?):* este punto se resolvió con la propuesta de inserción de un nuevo texto en el apartado 3 de la norma;

- *Guía sobre cómo tener en cuenta las muestras autolisadas en el proceso de validación:* el Grupo trató este punto en el apartado 2.2.c. recomendando la evaluación de los efectos de la autólisis tras el reconocimiento provisional del ensayo;
- *Plantilla para documentar la fuente y características de las muestras de referencia:* el Grupo indicó que una plantilla no cubría todas las situaciones, por consiguiente, no era apropiada. En lugar de la plantilla, el Grupo optó por enmendar la lista en el segundo párrafo de la introducción del apartado 2.2 describiendo los requisitos mínimos de la fuente y características de las muestras de referencia;
- *Falta de prueba estándar de comparación para algunas enfermedades:* el Grupo consideró que este punto ya se había tratado en el apartado 3 con la referencia al análisis de clase latente;
- *Mantenimiento de pruebas existentes que han sido utilizadas con éxito históricamente por los laboratorios de referencia:* el Grupo acordó que todas las pruebas debían validarse sin excepción, y que no habría exención basada en criterios históricos de las pruebas que habían sido usadas por los Laboratorios de Referencia.

El Grupo añadió explicaciones y mejoras en todos los apartados de la norma con objeto de ofrecer al usuario el mayor apoyo posible para abordar y superar las restricciones comunes del análisis en la fauna silvestre.

El Grupo recomendó que las Etapas de validación 1 y 2a de las pruebas de campo (tests rápidos en el animal) fuesen completadas por el fabricante antes de la distribución comercial del kit, y que de este modo se intensificaría la colaboración con los laboratorios de diagnóstico mejorándose potencialmente la interpretación de los resultados por los usuarios finales de la prueba.

El Grupo facilitó una orientación sobre la selección del procedimiento de validación más idóneo en la introducción del apartado 3 de la norma.

En un esfuerzo por armonizar la terminología usada en esta norma con el Capítulo 1.1.5. del *Manual Terrestre*, se decidió sustituir “aceptación provisional” al final de la Etapa 2a por “reconocimiento provisional”.

El Grupo añadió apartados sobre las Etapas de validación 1, 3 y 4, que no se habían discutido de manera pormenorizada en la última reunión debido a limitaciones de tiempo. Se prestó particular atención a tratar los aspectos de reproducibilidad que podrían plantear problemas específicos para la validación de las pruebas de diagnóstico en la fauna silvestre.

Tras las modificaciones de las pruebas validadas, el Grupo formuló recomendaciones relativas a la reevaluación.

El proyecto de norma finalizado por el Grupo se adjunta como Anexo III.

## 5. Otros asuntos

Una vez finalizado el proyecto de norma, el Grupo formuló las siguientes propuestas sobre el proyecto de versión actualizada del Capítulo 1.1.5. para mantener la congruencia entre ambos documentos:

En lo referente a la Introducción:

- mencionar que todos los ensayos de diagnóstico (ensayos de laboratorio y de campo) necesitan ser validados para la especie en la cual se utilicen;
- añadir una referencia a los “Principios y métodos para la validación de pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas aplicables a los animales salvajes”;
- resaltar que si bien la información proporcionada en el anexo sobre la fauna silvestre se aplica específicamente a las especies silvestres, también podría ser útil para la validación de pruebas de diagnóstico en animales domésticos, por ejemplo, si el número o la disponibilidad de las muestras fuese limitado.

En lo referente al apartado A. Procedimiento de desarrollo del ensayo:

- trasladar el párrafo 1.b) sobre la idoneidad para el uso al apartado “B. Procedimiento de validación del ensayo, 4. Etapa 4 – Puesta en práctica del programa” donde es más pertinente. Además, el párrafo debía incluir consideraciones sobre otras pruebas disponibles para su posible uso en combinación con la prueba validada.

En lo referente al apartado B. Procedimiento de validación del ensayo:

- trasladar el reconocimiento provisional, actualmente al final de la Etapa 1 del capítulo, al inicio de la Etapa 2.

Comentarios adicionales:

El Grupo recomendó que la Directriz de validación 6 “Comparabilidad de los métodos de ensayos tras modificaciones menores en el método de prueba validado”, en curso de elaboración, también abarcara las pruebas de detección de anticuerpos, dado que estas se usaban ampliamente en la fauna silvestre y en los animales domésticos. El Grupo sugirió elaborar un nuevo documento en vez de insertar un texto en las actuales Directrices de validación para facilitar su uso.

El Grupo no propuso convocar otra reunión, a menos que la Comisión de Normas Biológicas lo requiriese.

**6. Aprobación del informe**

El Grupo aprobó el informe preparado por el relator con ayuda de la secretaria de la OIE.

---

.../Anexos

Anexo I

**REUNIÓN DEL GRUPO *AD HOC* DE LA OIE  
SOBRE LA VALIDACIÓN DE PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO EN LOS ANIMALES SILVESTRES  
París, 15 - 17 de enero de 2013**

\_\_\_\_\_

**Temario**

1. Apertura
2. Designación del presidente y del relator
3. Aprobación del temario
4. Finalización del proyecto de norma “Principios y métodos para la validación de pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas aplicables a los animales salvajes”
5. Otros asuntos
6. Aprobación del informe.

\_\_\_\_\_

**REUNIÓN DEL GRUPO AD HOC DE LA OIE  
SOBRE LA VALIDACIÓN DE PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO EN LOS ANIMALES SILVESTRES  
París, 15 - 17 de enero de 2013**

**Lista de participantes**

**MIEMBROS**

---

**Prof. John Fischer**

*(Miembro del Grupo de trabajo de la OIE sobre las enfermedades de los animales salvajes)*  
Southeastern Cooperative Wildlife Disease Study  
College of Veterinary Medicine  
University of Georgia, Athens - GA 30602 EE.UU.  
Tel.: (1-706) 542 1741  
Fax: (1-706) 542 5865  
E-mail: jfischer@uga.edu

**Prof. Ian Gardner**

Canada Excellence Research Chair  
Aquatic Epidemiology  
Atlantic Veterinary College (3N)  
550 University Ave. Charlottetown  
Prince Edward Island, C1A 4P3  
CANADÁ  
Tel.: +1 902 620 5059  
Fax: +1 902 620 5053  
iagardner@upei.ca

**Dra. Dolores Gavier-Widén**

Dept of Pathology and Wildlife Diseases  
National Veterinary Institute (SVA)  
SE-75189 Uppsala  
SUECIA  
Tel.: (46) 18 674215  
Fax: (46) 18 309162  
dolores@sva.se

**Prof. Anita L. Michel**

Dept Veterinary Tropical Diseases Faculty  
of Veterinary Science University of  
Pretoria Private Bag X4 Onderstepoort  
0110  
SUDÁFRICA  
Tel.: (27) 12 5298426  
Fax: (27) 12 5298312  
Anita.Michel@up.ac.za

**Prof. Parntep Ratanakron**

Monitoring and Surveillance Center for  
Zoonotic Diseases in Wildlife and Exotic  
Animals (MOZWE)  
Faculty of Veterinary Science  
Mahidol University  
Salaya Campus  
Nakornpathom 73170  
TAILANDIA  
Tel.: +66 (0) 2441-0931-2  
Fax: +66 (0) 2441-0937  
parntep.rat@mahidol.ac.th

**REPRESENTANTE DE LA COMISIÓN DE NORMAS BIOLÓGICAS**

---

**Prof. Vincenzo Caporale**

*(Presidente de la Comisión de Normas Biológicas de la OIE)*  
Colleaterrato Alto  
64100 Teramo  
ITALIA  
Tel.: +39 348 79 78 711  
v.caporale@oie.int

**SEDE DE LA OIE**

---

**Dr. Bernard Vallat**

Director General  
12 rue de Prony  
75017 Paris  
FRANCIA  
Tel.: 33 - (0)1 44 15 18 88  
Fax: 33 - (0)1 42 67 09 87  
oie@oie.int

**Dra. Elisabeth Erlacher-Vindel**

Jefa adjunta del Departamento Científico y Técnico  
e.erlacher-vindel@oie.int

**Dr. François Diaz**

Comisionado  
Departamento Científico y Técnico  
f.diaz@oie.int

Anexo III**Principios y métodos para la validación de pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas aplicables a los animales salvajes****1. Introducción**

La realización de pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas en los animales salvajes adquiere cada vez más importancia a medida que crece el interés en las enfermedades presentes en la fauna silvestre que pueden tener repercusiones sobre las poblaciones de animales salvajes y la biodiversidad, así como sobre la salud de hombre y de los animales domésticos. A efectos de la presente norma, “fauna silvestre” designa los animales pertenecientes a al menos uno de los siguientes grupos:

- *Animales salvajes*: Aquellos animales que no viven bajo la supervisión o el control del hombre y cuyo fenotipo no ha sido seleccionado por el hombre.
- *Animales salvajes cautivos*: Aquellos animales que viven bajo la supervisión o el control del hombre pero cuyo fenotipo no ha sido seleccionado por el hombre.
- *Animales asilvestrados*: Aquellos animales que no viven bajo la supervisión o el control del hombre pero cuyo fenotipo ha sido seleccionado por el hombre.

Los animales salvajes son en general susceptibles a las infecciones causadas por los mismos agentes patógenos que los animales domésticos, y en algunos casos, las pruebas desarrolladas y validadas en otras especies pueden ser útiles para las especies salvajes. No obstante, los ensayos de diagnóstico en la fauna silvestre pueden plantear más desafíos que en los animales domésticos por diversas razones, entre otras, las dificultades de acceso a los animales y a las muestras, la pobre calidad de las muestras, el escaso conocimiento de la patogénesis o la epidemiología de la enfermedad en la fauna silvestre, y las regulaciones locales o internacionales que limitan o prohíben la posesión y/o expedición internacional de muestras. El carácter asequible de las pruebas es un criterio esencial, porque los animales salvajes y asilvestrados no tienen propietarios que puedan asumir los costes asociados. De ahí que, un bajo coste puede ser un factor crítico en la selección de pruebas para su uso con un fin determinado.

Se han desarrollado varias pruebas de diagnóstico de rutina que se utilizan actualmente para la detección o confirmación de enfermedades en los animales domésticos, pero que no han sido validadas en la fauna silvestre. La cuestión radica en determinar si existen diferencias esenciales en la sensibilidad o especificidad diagnósticas de estas pruebas cuando se aplican a muestras de la fauna silvestre.

Cabe distinguir arbitrariamente dos categorías de pruebas de diagnóstico: técnicas directas e indirectas de identificación. Los métodos directos de pruebas de diagnóstico para identificar agentes incluyen exámenes microscópicos, cultivos –comúnmente usados para aislar bacterias, virus, hongos y algunos protozoos–, y técnicas moleculares –como la amplificación del material genético del agente por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y codificación de secuencias de inmunoproteínas–. Lo que es más importante es que estas técnicas directas de diagnóstico por identificación del agente no estén afectadas en teoría por la especie del hospedador, es decir, animales domésticos o fauna silvestre. Sin embargo, puede haber cierta variación por especie en la tasa de proliferación o amplificación del agente, que puede afectar la cantidad y distribución de los patógenos y sus productos en los hospedadores. Los métodos indirectos de prueba están basados en la detección de la respuesta inmune de la célula o anticuerpo del animal frente a un patógeno. A diferencia de los métodos directos, la detección de la respuesta inmune necesita con frecuencia el uso de reactivos específicos para una especie, lo que complica este enfoque diagnóstico en especies de la fauna silvestre que no se benefician de las pruebas existentes validadas en especies estrechamente emparentadas. La determinación del estado real de infección de los animales identificados como infectados o expuestos en un ensayo serológico requiere la confirmación mediante un ensayo validado de detección directa.

La validación de las pruebas de diagnóstico para especies individuales de la fauna silvestre plantea varios desafíos, tales como la accesibilidad a un número y un volumen adecuados de muestras que se usarán en el proceso de validación. Los principios subyacentes y el enfoque por etapas para la validación de una prueba de diagnóstico se esbozan en el Capítulo 1.1.5. del *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres* de la OIE. El objeto de la norma descrita en los apartados 2 y 3 del presente documento es suministrar información específicamente para la validación de pruebas de diagnóstico aplicables a la fauna silvestre que serán reconocidas por la OIE (cumplimiento de las etapas 1, 2 y 3 del procedimiento de validación). No obstante, reconociendo que no siempre será necesario, o posible, completar este proceso, se facilitan pautas para seguir el Procedimiento de Validación hasta el punto en que sea posible reconocer provisionalmente que la prueba ofrece confianza en los resultados y puede usarse en aplicaciones específicas en un contexto regional o nacional (para más detalles, véase el apartado B.1.g del Capítulo 1.1.5.).

El reconocimiento provisional de un ensayo para especies de la fauna silvestre exige que se cumplan la Etapa 1 (características analíticas) y la Etapa 2a (estimaciones preliminares de la Sensibilidad Diagnóstica [DSe] y de la Especificidad Diagnóstica [DSp]) del Procedimiento de Validación. La evaluación de la Etapa 2a que utiliza un conjunto de muestras de referencia positivas y negativas para evaluar el rendimiento diagnóstico es considerada esencial, habida cuenta de la diversidad de especies dentro de las familias taxonómicas, de los factores variables de los hospedadores que pueden influir en la patogénesis de las infecciones y de la diversidad de la ecología de las enfermedades. La explicación pormenorizada de la evaluación de la Etapa 2a se presenta en el apartado 3 de esta norma. Para que un ensayo provisionalmente reconocido alcance la plena validación, mediante el procedimiento de la OIE, para el uso previsto originalmente, también es preciso completar las Etapas 2b y 3 del procedimiento.

## 2. Principios de validación de las pruebas

La validación es un proceso que determina que un ensayo, debidamente desarrollado, optimizado y estandarizado, es apto para el fin perseguido. Idealmente, el proceso de validación de pruebas para la fauna silvestre debe llevarse a cabo del mismo modo que el de las pruebas para los animales domésticos (presentado en el Capítulo 1.1.5.). Sin embargo, como se ha explicado arriba, los ensayos de diagnóstico en la fauna silvestre con frecuencia plantean dificultades que imponen ciertas limitaciones a la perspectiva de una validación completa. Por consiguiente, en los casos en que la validación completa no sea viable, la mejor alternativa puede ser evaluar la idoneidad del ensayo para la fauna silvestre en un número reducido de muestras de referencia. Las estimaciones preliminares del rendimiento de la prueba pueden aportar suficiente información como para que las autoridades gubernamentales decidan que una prueba puede ser reconocida provisionalmente para su uso en animales que se desplazan o trasladan, o para la vigilancia de patógenos en un país.

En varios casos, las pruebas de diagnóstico preexistentes validadas para una especie pueden adaptarse y evaluarse en otra especie con modificaciones mínimas o sin modificaciones. En otros casos, puede ser necesario desarrollar nuevas pruebas para la fauna silvestre. En todos los casos, los fines perseguidos y las aplicaciones de la prueba deben determinarse y definirse antes de su desarrollo y validación, ya que pueden tener repercusiones sobre la selección de las muestras de referencia apropiadas y, en última instancia, sobre la extrapolación de los resultados de validación.

El desarrollo de pruebas de campo rápidas y fáciles de realizar (como las pruebas a pie de granja) para el diagnóstico de enfermedades en animales domésticos ha sido bien acogido por los usuarios finales y su uso en la fauna silvestre se está difundiendo cada vez más. El uso e interpretación de las pruebas de campo con frecuencia es la responsabilidad exclusiva del personal veterinario que atiende casos en el campo sin apoyo de laboratorio. Por lo tanto, la validación de estas pruebas por el fabricante mediante la Etapa 2a es esencial para facilitar la correcta interpretación de los resultados. Los kits de pruebas usados en el campo, en vez de en condiciones de laboratorio, deben ser evaluados en términos de reproducibilidad de resultados bajo diferentes condiciones ambientales (temperatura, humedad, etc.).

### 2.1. Idoneidad para el uso

En el Capítulo 1.1.5 se indica una lista de fines perseguidos con las pruebas de diagnóstico. En lo referente a los ensayos en la fauna silvestre, más concretamente, los principales fines perseguidos en el desarrollo y aplicación de una prueba de diagnóstico son los siguientes:

- 1) Cribado de las poblaciones de fauna silvestre para detectar la presencia de agentes infecciosos, por ejemplo:
  - a) para la vigilancia (detección precoz, evaluación de tendencias en la prevalencia o la incidencia)
  - b) para la estimación de la prevalencia de infección o exposición
- 2) Cribado o prueba de vectores o de muestras ambientales para detectar la presencia de agentes infecciosos
- 3) Confirmación de un diagnóstico de casos sospechosos o casos clínicos (con confirmación de resultados positivos a partir de una prueba de cribado)
- 4) Certificación del estado libre de infección o presencia del agente en animales individuales o en los productos, para
  - a) movimiento o traslado
  - b) consumo humano
- 5) Seguimiento de la distribución geográfica y de las modificaciones de prevalencia debidas a intervenciones de gestión (con determinación del estado inmune de los individuos o de las poblaciones de animales)
- 6) Estudio del agente, del hospedador y de los factores ambientales asociados a la aparición de la enfermedad.

## 2.2. Muestras de referencia y calidad de las muestras

Las muestras de referencia deben representar la condición que es el objetivo de interés, por ejemplo, enfermedad clínica, infección subclínica. La experiencia indica que si se efectúa una selección inadecuada de muestras de referencia positivas de animales afectados clínicamente, cuando la prueba se utiliza para detectar la infección subclínica, las estimaciones de sensibilidad y especificidad resultantes son excesivamente optimistas. Los animales infectados experimentalmente pueden ser la única fuente de las muestras de referencia en algunos casos, pero siempre que sea posible, su uso debe complementarse con muestras de animales infectados naturalmente.

Por definición, todas las muestras de referencia deben estar bien caracterizadas en términos del hospedador y su población de origen, y del agente infeccioso implicado. Aunque sería recomendable contar con el mismo detalle descriptivo para las muestras de referencia de la fauna silvestre en comparación con los animales domésticos, la información pertinente con frecuencia no está disponible. En tales casos, debe registrarse la mayor cantidad de detalles posible. Los requisitos mínimos para caracterizar adecuadamente una muestra de referencia son: a) la especie precisa del hospedador, y si es posible la subespecie, b) las pruebas usadas para la confirmación de la presencia o ausencia del patógeno/anticuerpo, c) la situación geográfica en relación con áreas o regiones reconocidas libres de enfermedad o infectadas, d) la fecha de recogida de la muestra y e) el tipo de muestra. Siempre que sea posible, la información sobre el sexo, categoría de edad (juvenil, subadulto, adulto), ausencia o presencia de signos clínicos y descripción de los signos aportará datos valiosos.

### a) Fondo de muestras de referencia

Idealmente, las muestras de referencia deben obtenerse a partir de los individuos y dividirse en alícuotas en volúmenes (pesos) más pequeños para los ensayos subsecuentes. Sin embargo, cuando las muestras de referencia proceden de animales de baja masa corporal o cuando hay muy pocos animales infectados con el agente particular de interés, la reunión de muestras es aceptable para obtener una muestra de referencia. De preferencia, debe conocerse la etapa de infección de los animales individuales. Una muestra altamente positiva de buena calidad puede diluirse con la misma matriz de muestra, por ejemplo, heces o suero, de la misma especie hospedadora para generar una serie de muestras con concentraciones decrecientes del agente o productos de la respuesta inmune. Si algunas etapas de infección no están disponibles, debe registrarse la información.

En los casos en que solo se disponga de un volumen limitado de muestra adecuada de buena calidad, podrá usarse como muestra de referencia en apoyo de un conjunto bien definido de series de prueba (por ejemplo, un estudio de repetibilidad).

### b) Muestras de referencia negativas y muestras de estado de infección desconocido

Si no se dispone de muestras de referencia negativas para determinar la especificidad diagnóstica en términos de ciertos agentes conocidos que causan una reactividad cruzada, debe registrarse la información.

Los modelos estadísticos de clases latentes para la estimación de la sensibilidad y especificidad diagnósticas a falta de un estándar de referencia perfecto (a veces denominado “estándar de oro”) necesitan la validación de ensayos de diagnóstico para la fauna silvestre. Este enfoque puede ser particularmente útil para evaluar la sensibilidad de los ensayos de detección de ácido nucleico en comparación con el aislamiento de virus, bacterias y parásitos. Los modelos de análisis de clases latentes tienen supuestos inherentes y requieren una descripción exhaustiva de la población de origen, que puede ser difícil o imposible de obtener para la fauna silvestre libre (para más detalles, véase el Capítulo 1.1.5. y la Directriz de validación 5 sobre la evaluación estadística).

### c) Calidad de la muestra

El entorno de muestreo para la fauna silvestre con frecuencia es subóptimo y puede conducir a una contaminación cruzada. Por añadidura, un muestreo oportunista constituye un aspecto importante en el cribado y seguimiento de las poblaciones de fauna silvestre para detectar agentes infecciosos. El resultado puede ser que se recojan muestras de integridad comprometida (por ejemplo, contaminación, autólisis avanzada). Por consiguiente, los investigadores son responsables de determinar el grado de adecuación de tales muestras para la validación de pruebas; sin embargo, dada la escasez general de muestras para ciertas condiciones o a partir de ciertas especies hospedadoras (por ejemplo, especies en peligro de extinción), deben tomarse las precauciones necesarias para garantizar un aprovechamiento máximo de muestras de calidad subóptima. En las bases de datos donde constan las características de las muestras de referencia debe registrarse una evaluación cualitativa de la muestra (por ejemplo, buena o baja calidad, autolisada).



Por tanto, se considera útil y necesario validar pruebas apropiadas para una gama de criterios de condición de las muestras, tales como modificaciones en la detectabilidad con el tiempo, bajo diferentes temperaturas de almacenaje, durante la autólisis, etc. Sin embargo, esta etapa del proceso de validación debe llevarse a cabo después del reconocimiento provisional de la prueba.

### 3. Procedimientos y etapas de validación de las pruebas en la fauna silvestre

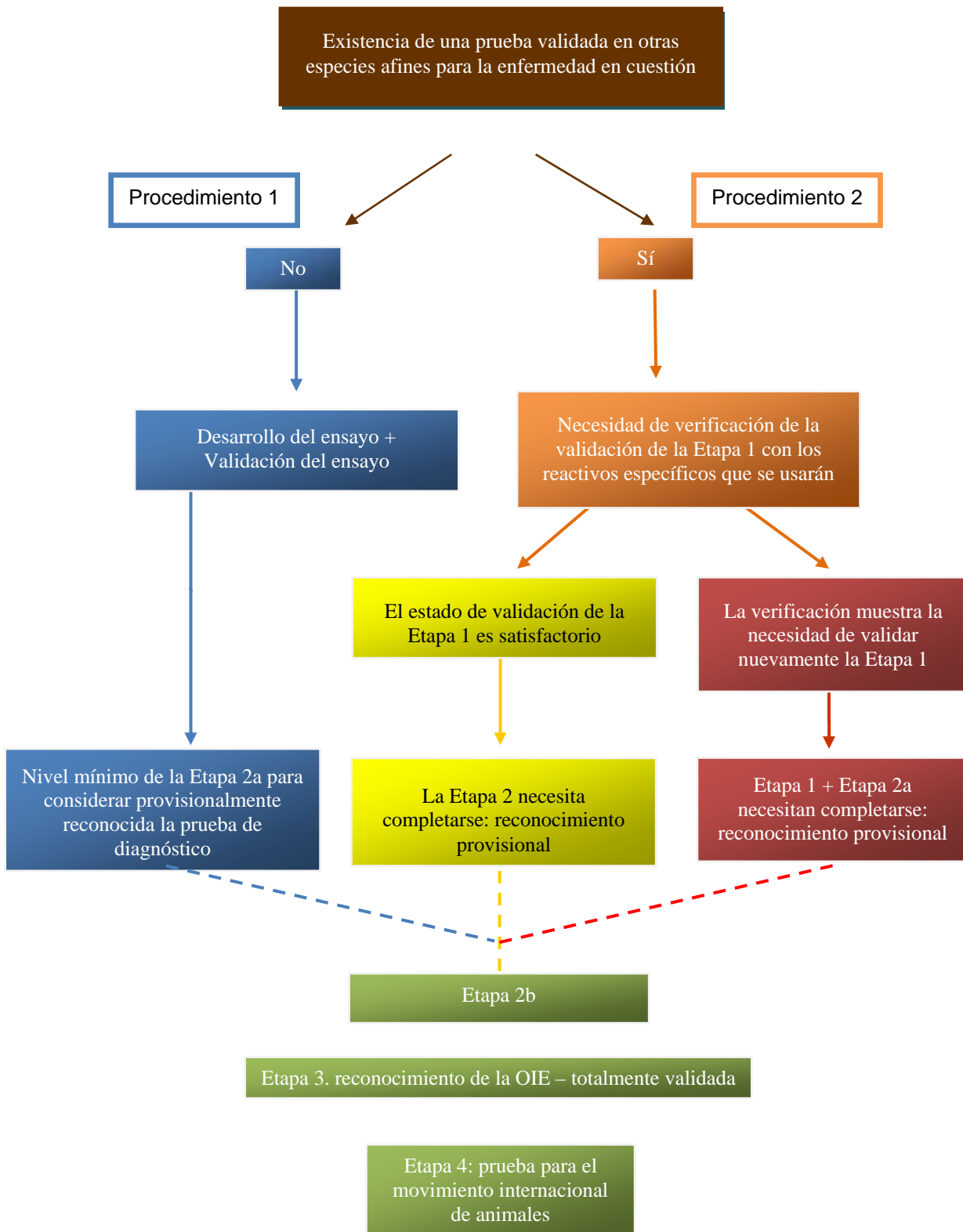
#### 3.1. Introducción

Los dos contextos, considerados en esta norma, implican la falta de disponibilidad (Procedimiento 1) o la disponibilidad de una prueba validada en otra especie afín (Procedimiento 2) para un mismo patógeno. El diagrama (figura 1) y el cuadro 1 muestran las etapas del proceso de validación. Los requisitos correspondientes para satisfacer los criterios de validación y estimar las características de rendimiento se muestran en el cuadro 1. La relación taxonómica de la especie debe ser una consideración primaria en la elección del procedimiento aplicable (Procedimiento 1 o 2, véase el cuadro 1), en particular cuando se usan métodos indirectos de prueba. También deben tomarse en consideración otros criterios, tales como el comportamiento de los animales, la variación en las cepas patógenas o la ecología de las enfermedades. En la mayoría de los casos que implican la fauna silvestre, el Procedimiento 1 es apropiado, habida cuenta de la falta de pruebas validadas en especies estrechamente emparentadas. Si se opta por el Procedimiento 2, su uso debe justificarse con documentación de la existencia de una prueba validada.

**Cuadro 1:** Procedimiento de validación: Etapas requeridas para satisfacer los criterios de validación descritos en el Capítulo 1.1.5. y estimar las características de la prueba. Los requisitos de las diferentes etapas tienen que cumplirse con un resultado aceptable.

<i>Procedimiento de validación Capítulo 1.1.5.</i>	<i>Procedimiento 1: Prueba no validada en especies afines</i>	<i>Procedimiento 2: Prueba validada en especies afines</i>
<b>Etapa 1</b>	<b>Etapa 1 verificada en nuevas especies diana</b>	<b>Etapa 1 verificada en nuevas especies diana</b>
Especificidad analítica	Sí	Sí
Sensibilidad analítica	Sí	Sí
Repetibilidad	Sí	No
Reproducibilidad (preliminar)	Sí	No
<b>Etapa 2</b>	<b>Etapa 2a (reconocimiento provisional)</b>	<b>Etapa 2a (reconocimiento provisional)</b>
Sensibilidad diagnóstica	Sí (mínimo de 30 muestras de referencia positivas)	Sí (mínimo de 10 muestras de referencia positivas)
Especificidad diagnóstica	Sí (mínimo de 30 muestras de referencia negativas)	Sí (mínimo de 10 muestras de referencia negativas)
Determinación del umbral	Sí (total de 60 muestras)	Sí (total de 20 muestras)
Descripción de la muestra de referencia	Sí	Sí
	<b>Etapa 2b</b>	<b>Etapa 2b</b>
Sensibilidad diagnóstica	Sí	Sí
Especificidad diagnóstica	Sí	Sí
Determinación del umbral	Sí	Sí
Descripción de la muestra de referencia	Sí	Sí
<b>Etapa 3</b>	<b>Etapa 3</b>	<b>Etapa 3</b>
Reproducibilidad	Sí	Sí
Repetibilidad	Sí	Sí
<b>Etapa 4</b>	<b>Etapa 4</b>	<b>Etapa 4</b>
Valores predictivos (poblaciones)	Sí	Sí

**Figura 1:** Diagrama de procedimientos y etapas de la validación de pruebas en la fauna silvestre si existe, o no, una prueba previamente validada



### 3.2. Consideraciones adicionales respecto al procedimiento de validación general descrito en el Capítulo 1.1.5.

#### a) *Etapas 1 – Estimación de las características analíticas*

La estimación de las características analíticas debe seguir las recomendaciones establecidas en el Capítulo 1.1.5.

En función de la existencia de métodos de prueba de diagnóstico validados conforme al procedimiento de la OIE para otras especies, las características que requieren validación podrán diferir. Si no existe un método validado de prueba de diagnóstico, todas las características de la Etapa 1 deben ser evaluadas (Procedimiento 1). Si ya existe un método validado de prueba de diagnóstico, la repetibilidad y reproducibilidad (preliminar) no necesitarán ser reevaluadas hasta la Etapa 3 (Procedimiento 2).

Dado que con frecuencia se desconoce la diversidad de organismos de reacción cruzada, la evaluación de la especificidad analítica puede ser más difícil que en los animales domésticos.

#### b) *Etapas 2 – Estimación de las características de diagnóstico*

La estimación de las características de diagnóstico debe seguir las recomendaciones establecidas en el Capítulo 1.1.5.

Para fines de diagnóstico en la fauna silvestre, se propone dividir la Etapa 2 en las Etapas 2a y 2b. La Etapa 2a necesita completarse para el “reconocimiento provisional”, tal como se ha descrito previamente. En la Etapa 2a, se supone que el procedimiento basado en una prueba validada existente para una enfermedad en animales domésticos afines (en comparación con la prueba no validada) está basado en al menos 10 muestras de referencia positivas y 10 muestras de referencia negativas, y las estimaciones de DSe y DSp son similares, si no idénticas, en las dos especies. Estas muestras apoyan el uso de un tamaño reducido de muestras (Procedimiento 1 frente a Procedimiento 2 en el cuadro 1). La selección del procedimiento con un tamaño reducido de muestras (Procedimiento 2) debe justificarse sobre la base del tamaño de la muestra y la comparabilidad evidenciada (por ejemplo, el mismo valor del umbral de prueba y los mismos reactivos) según las publicaciones revisadas por los pares.

El tamaño de las muestras seleccionadas para completar la Etapa 2 (Etapa 2b) debe basarse en los valores esperados de sensibilidad (DSe) y especificidad (DSp) diagnósticas, nivel de confianza deseado y margen de error tal como se muestra en el cuadro 1 del Capítulo 1.1.5. Por ejemplo, para una DSe o DSp prevista del 90%, se requiere un tamaño de 138 muestras para producir un margen de error del 5% con una confianza al 95% (véase la parte derecha del cuadro 1 en el Capítulo 1.1.5.). Sin embargo, se reconoce que puede ser difícil obtener este número de muestras de referencia realmente positivas y negativas para ciertas especies de fauna silvestre y solo podría alcanzarse potencialmente cuando se combinan con el tiempo los datos de los diversos laboratorios de ensayos que usan la misma prueba de manera estandarizada. En consecuencia, el número inicial de muestras analizadas puede ser inferior a los números recomendados en el cuadro 1 del Capítulo 1.1.5.

Si el número de muestras de referencia (positivas y negativas) es inferior al número indicado en el cuadro 1 del Capítulo 1.1.5., los márgenes de error calculados sobre las estimaciones (usualmente representadas como intervalos de confianza al 95%) de DSe y DSp, respectivamente, serán más amplios que aquellos en los que está basado el cuadro. En consecuencia, los tamaños pequeños de muestras aumentan la incertidumbre en las características de rendimiento de la prueba. El uso de muestras de referencia que sean representativas de la condición objetivo es crítico para alcanzar una estimación sin sesgo (y prácticamente útil) de DSe y DSp que resistirá un examen con el paso del tiempo. Por ejemplo, las muestras deben obtenerse a partir de animales con infección subclínica si la prueba en curso de validación se va a utilizar en animales aparentemente sanos. Por tanto, la obtención y uso de muestras representativas de la condición objetivo es más importante que el tamaño de la muestra.

El efecto neto de un tamaño inferior de las muestras aumenta la incertidumbre en las estimaciones a menos que la información previa de DSe y DSp en la especie afín esté formalmente incorporada mediante un análisis bayesiano. El cuadro 2 muestra el efecto del uso de un máximo de 140 muestras positivas conocidas cuando, una vez recogidas y analizadas las muestras de campo, se efectúa la estimación de DSe (90%).

**Cuadro 2:** Márgenes de error aproximados e intervalos de confianza al 95% de sensibilidad diagnóstica (DSe) para números decrecientes de muestras de referencia positivas

Número de muestras de referencia positivas	Número positivas	DSe (%)	Margen de error aproximado sobre la estimación de DSe	Intervalo de confianza al 95% por método binomial exacto para DSe (%)
140	126	90	± 0,05	83,8 – 94,4
100	90	90	± 0,06	82,4 – 95,1
60	54	90	± 0,08	79,5 – 96,2
30	27	90	± 0,10	73,5 – 97,9
10	9	90	± 0,18	55,5 – 99,7

Los cálculos para intervalos de confianza al 95% para DSp son afectados de modo similar por el número de muestras de referencia negativas utilizadas.

**c) Etapa 3 – Reproducibilidad**

En general, son aplicables las recomendaciones establecidas en el Capítulo 1.1.5 para la evaluación de la reproducibilidad, lo que significa que un mínimo de 20 muestras debe ser analizado por 3 laboratorios diferentes en 3 regiones o países distintos. En los casos en que una prueba particular en la fauna silvestre sea realizada por muy pocos laboratorios o países, o si el intercambio de muestras de fauna silvestre a través de las fronteras internacionales puede ser regulado por el convenio CITES<sup>1</sup>, la evaluación de la reproducibilidad puede diferirse a una etapa ulterior cuando la prueba haya sido adoptada por suficientes laboratorios o se haya podido obtener el permiso CITES.

**d) Etapa 4 Interpretación de los resultados de la prueba**

La interpretación de resultados de la prueba (valores predictivos) en todas las especies depende del conocimiento de la prevalencia en la población diana. Es un dato difícil de conocer *a priori* en la mayor parte de las poblaciones de fauna silvestre en libertad e incluso en poblaciones cautivas en que se conoce el tamaño de la población, puede haber variaciones sustanciales en la prevalencia entre las poblaciones. De ahí que, puede ser poco razonable esperar que los cálculos de valor predictivo se efectúen con certeza en la mayoría de poblaciones de fauna silvestre. En las situaciones limitadas en que se puede determinar una prevalencia real, los valores predictivos de los resultados de la prueba en estas poblaciones no deben extrapolarse a otras poblaciones.

**e) Seguimiento del rendimiento del ensayo tras la validación inicial: modificaciones y mejoras – consideraciones de cambios en el ensayo**

Las modificaciones en el protocolo de la prueba validada pueden tener importantes repercusiones sobre el rendimiento de la prueba. Los ejemplos incluyen: el uso de fluidos orgánicos recolectados de animales vivos o muertos (tales como líquido ascítico, extracto del pulmón o líquido pleural) para una prueba de detección de anticuerpos validada para suero, un cambio en la naturaleza o fuente de los reactivos y un cambio en los parámetros cíclicos de un protocolo PCR.

Cualquier modificación exigirá, por consiguiente, una reevaluación limitada de las características analíticas (Etapa 1). Si las características son comparables con el protocolo inicial, sin cambio significativo, el proceso de validación puede continuar a partir del punto en que se produce el cambio. Si las características analíticas cambian significativamente, las Etapas 1 y 2a deben repetirse completamente.

<sup>1</sup> CITES: Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres

**REUNIÓN DEL GRUPO AD HOC SOBRE LA CALIDAD DE LAS VACUNAS  
CONTRA LA PESTE PORCINA CLÁSICA (PPC)  
París, 4–6 de septiembre de 2012**

---

El Grupo *ad hoc* de la OIE sobre la calidad de las vacunas contra la peste porcina clásica (PPC) se reunió en la sede de la OIE, en París, del 4 al 6 de septiembre de 2012. El objetivo de la reunión fue revisar la Sección C del Capítulo 2.8.3. relativo a la peste porcina clásica del *Manual Terrestre*.

**1. Apertura y propósito de la reunión**

El Dr. Kazuaki Miyagishima, director general adjunto, dio la bienvenida a los participantes en nombre del Dr. Bernard Vallat, director general de la OIE. A manera de introducción, explicó que existía un nuevo modelo de referencia para la redacción de la sección sobre los requisitos de las vacunas. Informó que el ciclo para comentario de los Países Miembros se había ampliado para las revisiones de los capítulos del *Manual*, y que, por lo tanto, sería aconsejable presentar un proyecto en la reunión de septiembre de la Comisión de Normas Biológicas, para tener una versión finalizada antes de finales de año.

**2. Aprobación del temario y designación del presidente y el relator**

El encuentro fue presidido por el Dr. Michel Lombard, y el Dr. Ralph Woodland fue designado como relator. El Dr. Lombard presentó el temario provisional que fue aprobado por el grupo. El temario y la lista de participantes figuran en el [Anexo I](#) y [II](#), respectivamente.

**3. Actualización y revisión de la Sección C (Requisitos para las vacunas y el material de diagnóstico) del Capítulo 2.8.3. relativo a la peste porcina clásica del *Manual Terrestre***

Se solicitó al Grupo seguir el modelo recientemente adoptado para la Sección C y que figura en el [Anexo III](#). El Grupo revisó el proyecto de texto para una sección sobre el contexto de la vacunación contra la peste porcina clásica preparado por el Dr. Lombard, basándose en un texto adoptado previamente para los capítulos de la fiebre aftosa y la rabia. El Grupo *ad hoc* tuvo en cuenta las modificaciones propuestas por los Dres. Sandra Blome, Frank Koenen, María T. Frías Lepoureau y Catherine Charreyre al aceptar el texto para el contexto de la sección.

El Grupo observó que la introducción general del capítulo sobre la PPC (Capítulo 2.8.3., Sección A) se centraba, principalmente, en la virología y hacía una corta descripción de la enfermedad sin evocar su impacto, las distintas situaciones epidemiológicas y las posibles medidas de control.

**Recomendación: El Grupo recomendó que se revisara la Sección A del capítulo para ampliar la introducción a los diferentes aspectos de la enfermedad y a su control.**

El Grupo discutió la manera de presentar la información sobre la producción de los diferentes tipos de vacunas (por ejemplo: vivas, atenuadas, recombinantes, orales, baculovirus derivados de subunidades) teniendo en cuenta el modelo estándar desarrollado. Si bien la presentación de todos los tipos de vacunas en la Sección C tiene ciertas ventajas puesto que disminuye las repeticiones, se estimó que, para más claridad, se debía organizar la información en secciones separadas. Por lo tanto, se acordó destacar independientemente los requisitos para las vacunas vivas, orales y de subunidades.

Con respecto a la producción de vacunas de virus vivos modificados, se estimó que las vacunas obtenidas de tejidos preparadas en animales vivos ya no respetaban los principios de bienestar animal de la OIE. Por razones de bienestar animal, es oportuno aclarar que las vacunas contra la PPC ya no deberían producirse utilizando animales vivos para el crecimiento del virus. Se aprobaron los proyectos de texto para las secciones relativas a las características biológicas de las cepas madre, los criterios de calidad y la validación como cepas vacunales.

Se tomó nota de que cierta información incluida en la sección sobre la validación de una vacuna en la versión anterior del capítulo se cubría en la sección sobre *Requisitos para la autorización/registro/comercialización* del nuevo modelo.

Con respecto al *método de producción*, se convino modificar el texto anterior para hacerlo menos específico y prescriptivo, y dejar abierta la posibilidad de emplear métodos alternativos, si se justifica. Se estableció que los cultivos celulares utilizados deberán cumplir con los requisitos del Capítulo 1.1.6.

Igualmente, se aceptó que todos los ingredientes usados para la producción deberán cumplir con los requisitos del Capítulo 1.1.6.

Se destacó que las pruebas de control de calidad efectuadas durante la producción dependerán del procedimiento de fabricación, y también deberán incluir la titulación del virus y la esterilidad del antígeno a granel. Se redactó un texto apropiado.

Además, se determinaron los requisitos para las pruebas del producto terminado. Se acordó que el método de preferencia para demostrar la potencia del lote era la titulación *in vitro* del virus, aunque existe la preocupación de que, en algunas áreas, no se pueda establecer una correlación suficiente entre los títulos virales y la potencia de las vacunas. Por consiguiente, en estos casos, se decidió mantener la realización de pruebas de eficacia en cada lote.

En lo que se refiere a los *Requisitos para la autorización/registro/comercialización*, el Grupo *ad hoc* acordó incluir la misma declaración sobre el proceso de producción que la empleada en el capítulo sobre la fiebre aftosa para evitar repeticiones con la sección anterior. No obstante, se decidió añadir comentarios que especifican que cada lote deberá ser producido a partir de la misma cepa madre.

El texto de la Farmacopea Europea (Ph. Eur.) se empleó como base para establecer los *requisitos de seguridad* para el registro. Sin embargo, se modificó el número de animales que se deben usar de 10 a 8, de acuerdo con la norma VICH<sup>1</sup> GL44 (este cambio también se introdujo en el texto de la Ph. Eur.). El periodo de observación de los animales se cambió de 21 días a al menos 14, tal y como lo propone la monografía de la Ph. Eur.

Con respecto a las pruebas para la *seguridad de las cerdas gestantes*, se debatió sobre la etapa de gestación más apropiada: se consideró muy pronto el caso de los 25–35 días como en los textos previos de la OIE, y demasiado tarde a los 80 días (como lo permite el texto de la Ph. Eur.). El Grupo acordó que lo más adecuado sería entre 55 a 70 días de gestación. Aún más, destacó la importancia de incluir una prueba para los virus en la sangre de los lechones antes de la ingestión del calostro, para garantizar que las cepas potenciales de vacuna no persistan en los lechones infectados.

Con respecto a las pruebas de *no transmisibilidad* de los virus de las vacunas, se adoptó sin cambios el texto de la Ph. Eur., destacando que, a diferencia del texto anterior, esto implica el uso de menos animales y que, como en el texto previo de la OIE, se ha de emplear el seguimiento serológico a través de controles de contacto en lugar de estudios de exposición.

Igualmente, se retuvo la monografía de la Ph. Eur. con modificaciones como base para la sección de *reversión a la virulencia*, para adecuarse a la directriz VICH GL41. Se estimó que no era apropiado permitir la posibilidad de cualquier incremento en la virulencia en el caso de la PPC y, por tanto, se decidió no incluir el texto respectivo de la directriz VICH.

---

1 VICH: Cooperación internacional para la armonización de los requisitos técnicos para el registro de medicamentos veterinarios

El Grupo decidió basarse en la sección sobre la eficacia de la vacuna del texto de la Ph. Eur y aplicar modificaciones menores. Al igual que en el texto anterior de la OIE, se brindaron recomendaciones sobre la dilución de la vacuna, y se discutió sobre la pertinencia de incluir un requisito para inducir la inmunidad estéril, además de la protección contra la enfermedad clínica, aunque finalmente no se incluyó este aspecto.

El Grupo discutió sobre la producción y los requisitos para los *marcadores de subunidad* de las vacunas (DIVA: diferenciación de la infección en animales vacunados). Se modificaron los textos que se habían acordado para las vacunas vivas en cuanto a los procedimientos de producción y las pruebas de control de la calidad del régimen de pruebas para la vacuna de subunidad E2, con el fin de tener en cuenta la naturaleza diferente de esta vacuna (inactivada, adyuvante). El Grupo se basó en los métodos empleados para la única vacuna de este tipo actualmente autorizada.

Se acordó que las pruebas de seguridad requeridas para la autorización de las vacunas de subunidad deberán ser aquellas generalmente aplicables a las vacunas inactivadas, y el texto final se inspiró del anterior aceptado para las vacunas contra la fiebre aftosa.

Se discutieron detenidamente los requisitos de eficacia para las vacunas de subunidad (DIVA) y se concluyó que, en principio, deberían aplicar los mismos requisitos de eficacia que los adoptados para las vacunas vivas, reconociendo que en algunas circunstancias el uso de las vacunas inactivadas con capacidad DIVA podría considerarse más importante que el cumplimiento de todas las normas de eficacia, por ejemplo, la habilidad para prevenir la replicación viral y la infección transplacental.

El debate continuó en torno a los requisitos de las vacunas orales. La producción y los métodos de prueba son similares a los de las vacunas inyectables a virus vivo modificado (MLV), salvo para la formulación final y las correspondientes diferencias a la hora de poner a prueba el producto final. Además, los requisitos para la fórmula del cebo necesitan presentarse por razones de registro. Las pruebas de seguridad y eficacia con fines de registro deben efectuarse por administración oral del líquido vacunal (sin formulación en el cebo) y, además, es imperativo confirmar la eficacia de la vacuna en los cebos. Asimismo, se destacó la importancia de demostrar la importancia de la seguridad para el medioambiente y para las especies a las que las vacunas orales de cebo no están destinadas.

#### **4. Otros asuntos**

No se trataron otros asuntos.

#### **5. Finalización y aprobación del proyecto de informe**

El Grupo aceptó el ofrecimiento del Dr. Woodland de redactar el primer borrador de la Sección C revisada. Se invita a los miembros del Grupo a presentar sus comentarios y a continuar el debate por la vía electrónica. La versión definitiva se anexará al presente informe.

---

.../Anexos

Anexo I

**GRUPO AD HOC SOBRE LA CALIDAD DE LAS VACUNAS CONTRA LA PESTE PORCINA CLÁSICA  
París, 4–6 de septiembre de 2012**

---

**Temario**

1. Apertura
2. Aprobación del temario y designación del presidente y del relator
3. Actualización y revisión de la Sección C (*Requisitos para las vacunas y el material de diagnóstico*) del Capítulo 2.8.3. relativo a la peste porcina clásica del *Manual de las Pruebas y de las Vacunas para los Animales Terrestres*
4. Otros asuntos
5. Aprobación del proyecto de informe.

---



**GRUPO AD HOC SOBRE LA CALIDAD DE LAS VACUNAS CONTRA LA PESTE PORCINA CLÁSICA**

París, 4–6 de septiembre de 2012

**Lista de participantes****MIEMBROS****Dr. Lawrence Elsken**

Animal and Plant Health Inspection Service  
Center for Veterinary Biologics  
USDA, APHIS, Veterinary Services  
P.O. Box 844  
Ames, Iowa 50010  
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA  
Tel: +1-800-752-6255  
Fax: +1-515 232 7120  
[Lawrence.A.Elsken@aphis.usda.gov](mailto:Lawrence.A.Elsken@aphis.usda.gov)

**Dr. Ralph Woodland**

Immunologicals Assessment Team  
Veterinary Medicines Directorate  
Woodham Lane, New Haw  
Addlestone, Surrey KT15 3LS  
REINO UNIDO  
Tel: +44-1932 33 69 11  
Fax: +44-1932 33 66 18  
[r.woodland@vmd.defra.gsi.gov.uk](mailto:r.woodland@vmd.defra.gsi.gov.uk)

**Dra. María Frias-Lepoureau**

Centro Nacional de Seguridad Agropecuaria  
CENSA  
Ministerio de Educación Superior  
La Habana  
CUBA  
[maria.frias@infomed.sld.cu](mailto:maria.frias@infomed.sld.cu)

**Dra. Sandra Blome**

Friedrich Loeffler Institute  
Institute of Diagnostic Virology  
Suedufer 10  
17493 Greifswald  
ALEMANIA  
[sandra.blome@fli.bund.de](mailto:sandra.blome@fli.bund.de)

**Dr. Frank Koenen**

CODA-CERVA  
Operational Director  
Interactions and Surveillance  
Groeselenberg, 99  
B-1180 Brussels  
BÉLGICA  
Tel: +32 2 379 05 18  
Fax: +32 2 379 04 01  
[frank.koenen@codacerva.be](mailto:frank.koenen@codacerva.be)

**Dr. Michel Lombard**

22 rue Crillon  
69006 Lyon  
FRANCIA  
Tel: +33 4 78 93 90 89  
[lombard.family@wanadoo.fr](mailto:lombard.family@wanadoo.fr)

**Representante de la Comisión de Normas Biológicas****Prof. Vincenzo Caporale**

Presidente, Comisión de Normas Biológicas  
Asesor regional de la OIE  
Colleaterrato Alto  
64100 Teramo  
ITALIA  
Tel: +39 348 79 78 711  
[caporalevincenzo@gmail.com](mailto:caporalevincenzo@gmail.com)

**Observadores****Dr. Danny Goovaerts**

Director Global R&D Governmentally Regulated Diseases  
MSD Animal Health  
Wim de Körverstraat 35  
5831 AN Boxmeer  
PAÍSES BAJOS  
[danny.goovaerts@merck.com](mailto:danny.goovaerts@merck.com)

**Dra. Catherine Charreyre**

Merial SAS  
29 Avenue Tony Garnier  
69007 Lyon  
FRANCIA  
[Catherine.Charreyre@merial.com](mailto:Catherine.Charreyre@merial.com)

**Sede de la OIE****Dr. Bernard Vallat**

Director general  
12 rue de Prony  
75017 París  
FRANCIA  
Tel: 33 - (0)1 44 15 18 88  
Fax: 33 - (0)1 42 67 09 87  
[oie@oie.int](mailto:oie@oie.int)

**Dr. Kazuaki Miyagishima**

Jefe  
Departamento científico y técnico  
[k.miyagishima@oie.int](mailto:k.miyagishima@oie.int)

**Dra. Susanne Münstermann**

Comisionada  
Departamento científico y técnico  
[s.munstermann@oie.int](mailto:s.munstermann@oie.int)

1 Anexo III

2

## CHAPTER 2.8.3.

3

**CLASSICAL SWINE FEVER**  
(hog cholera)

4

5

**SUMMARY**

6 *Classical swine fever (CSF), also known as hog cholera, is a contagious viral disease of pigs. The*  
7 *causative virus is a member of the genus Pestivirus of the family Flaviviridae, and is closely related to*  
8 *the viruses of bovine viral diarrhoea and Border disease. There is only one serotype of CSF virus*  
9 *(CSFV).*

10 *The disease may run an acute, subacute, chronic, late onset, or inapparent course, depending on a*  
11 *variety of viral and host factors of which the age of the animals, the virulence of the virus and the time*  
12 *of infection (pre- or post-natal) are of greatest importance. Adult pigs usually display less severe signs*  
13 *of disease than young animals and stand a better chance of survival. In pregnant sows, the virus may*  
14 *cross the placental barrier and reach the fetuses. In-utero infection with strains of the virus of*  
15 *moderate or low virulence can result in what is referred to as the 'carrier sow' syndrome followed by*  
16 *prenatal or early post-natal death, the birth of diseased piglets or an apparently 'healthy' but*  
17 *persistently infected litter. An outbreak of CSF has serious consequences for trade in pigs and pig*  
18 *products.*

19 *The highly variable clinical picture of CSF ~~often~~ precludes a diagnosis on clinical and pathological*  
20 *grounds alone. Laboratory methods are therefore essential for an unambiguous diagnosis. Detection*  
21 *of virus or viral nucleic acid in anticoagulated whole blood and of antibodies in serum are the methods*  
22 *of choice for diagnosing CSF in live pigs, whereas detection of virus, viral nucleic acid or antigen in*  
23 *organ samples is most suitable when the pig is dead.*

24 **Identification of the agent:** ~~The direct fluorescent antibody test (FAT) on cryostat sections of organs~~  
25 ~~from affected pigs can be used for the detection of CSF antigen. A panel of monoclonal antibodies~~  
26 ~~(MAbs) is used to determine whether the fluorescence is due to CSF or non-CSF Pestivirus antigens.~~  
27 ~~For the detection of CSF genome, polymerase chain reaction (PCR) is commonly used. The isolation~~  
28 ~~of CSFV should be attempted in pig kidney (PK-15, SK-6) cell lines, or other suitable CSFV permissive~~  
29 ~~cell lines. The cultures, which are generated from stocks that are Pestivirus free (and preferably free of~~  
30 ~~other contaminants, e.g. mycoplasmas, porcine circovirus), are examined for virus growth by~~  
31 ~~immunofluorescence or immunoperoxidase staining; positive isolates are further characterised by ~~the~~~~  
32 ~~use of MAbs and by partial genetic sequencing or, if that method is not available, by the use of~~  
33 ~~monoclonal antibodies (MAbs). Reverse transcription polymerase chain reaction protocols for the~~  
34 ~~identification of CSFV nucleic acid have now gained international acceptance and are being used in~~  
35 ~~several many laboratories, both for detection of the agent and differentiation from ruminant other~~  
36 ~~pestiviruses. The direct fluorescent antibody test (FAT) on cryostat sections of organs from affected~~  
37 ~~pigs can be used for the detection of CSF antigen. A panel of MAbs is used to determine whether the~~  
38 ~~fluorescence is caused by CSF or non-CSF Pestivirus antigens. **Antigen-capture** enzyme-linked~~  
39 ~~immunosorbent assays (ELISAs) **are also useful for herd screening, but must not be used on a**~~  
40 ~~**single animal basis.**~~

41 **Serological tests:** *Detection of virus-specific antibodies is particularly useful in herds suspected of*  
42 *having been infected at least 21 days previously with CSFV. Serological methods are also valuable for*  
43 *monitoring and for prevalence studies, and are essential if a country wishes to be internationally*  
44 *recognised as being free from the disease in the absence of vaccination.*

45 As CSFV cross-reactive antibodies against ~~ruminant other~~ pestiviruses are occasionally observed in  
 46 ~~breeding~~ pigs, screening tests have to be followed by confirmatory tests that are CSFV-specific.  
 47 Certain ELISAs are relatively CSFV-specific, but the definitive method of choice for differentiation is  
 48 the comparative neutralisation test, which compares the level neutralising titre of antibodies to different  
 49 Pestivirus ~~species~~ isolates.

50 ~~Requirements for vaccines and diagnostic biologicals:~~ Vaccines against CSF are based on live  
 51 virus that has been attenuated by passage through cell cultures or through a suitable host species that  
 52 is not of the family Suidae. The production of these modified live virus (MLV) vaccines is based on a  
 53 seed-lot system that has been validated with respect to virus identity, sterility, purity, safety,  
 54 nontransmissibility, stability and immunogenicity. If CSFV is used in the production of vaccine or in  
 55 challenge studies, the facility should meet the OIE requirements for Containment Group 4 pathogens.

56 ~~Effective inactivated, conventional whole virus vaccines are not available. In contrast to conventional~~  
 57 ~~MLV vaccines, new generation MLV Subunit 'marker vaccines' are now available, which capable of in~~  
 58 ~~contrast to MLV vaccines, inducing~~ antibodies that can be distinguished from antibodies induced by  
 59 field virus ~~using when an accompanying appropriate companion discriminatory diagnostic test is used~~  
 60 ~~may soon become available.~~ The presently registered subunit 'marker vaccine' is based on the major  
 61 envelope glycoprotein (E2-subunit) of CSFV, and is produced in insect cells using recombinant DNA  
 62 technology.

## 63 A. INTRODUCTION

64 The viruses that cause classical swine fever (CSF), bovine viral diarrhoea (BVD) and Border disease (BD) are  
 65 members of the family *Flaviviridae*, genus *Pestivirus*, and are closely related to each other, both antigenically and  
 66 structurally. Clinical signs and lesions seen at post-mortem examination in pigs affected with CSF are highly variable  
 67 due to both viral and host factors. Furthermore, (congenital) infections with ruminant pestiviruses in pigs ~~can~~  
 68 occasionally give rise to a clinical disease that is indistinguishable from CSF (Terpstra & Wensvoort, 1988; Vannier &  
 69 Carnero, 1985; Wensvoort & Terpstra, 1988).

70 CSF affects the immune system, a main characteristic being generalised leukopenia, which can often be detected  
 71 before the onset of fever. Immunosuppression may lead to concurrent infections, which can mask the clinical picture.

72 ~~Spread of disease in all age groups, accompanied by~~ Pyrexia, huddling, inappetance, dullness, weakness,  
 73 conjunctivitis and constipation followed by diarrhoea ~~and an unsteady gait~~ are the prevailing signs of disease in all  
 74 age groups. In addition, animals may display a staggering gait, ataxia or convulsions. Several days after the onset of  
 75 clinical signs, the ears, abdomen and inner thighs may especially show petechial haemorrhages or a purple  
 76 discoloration. Animals with acute disease die within 1–3–4 weeks. Sudden death in the absence of clinical illness is  
 77 not symptomatic of CSF.

78 Under certain circumstances related to the animals' age and condition, as well as to the virus strain involved,  
 79 subacute or chronic clinical illness may develop, which can be protracted for 2–4–several weeks or even months.  
 80 Chronic illness leads to a stunting of growth, anorexia, intermittent pyrexia and diarrhoea.

81 Congenital persistent infections may go undetected for months and may be confined to only a few piglets in the herd  
 82 or may affect larger numbers. The clinical signs are nonspecific: wasting in the absence of pyrexia. Chronic and  
 83 persistent infections always lead to the death of the animal. Herd mortality rates may be slightly above the expected  
 84 level. ~~CSF affects the immune system, a main characteristic being generalised leukopenia, which can often be~~  
 85 ~~detected before the onset of fever. Immunosuppression may lead to concurrent infections.~~

86 In acute cases, gross pathological lesions might be inconspicuous or absent. In typical cases, the lymph nodes are  
 87 swollen and marbled red, and haemorrhages occur on serosal and mucosal membranes of the intestinal organs.  
 88 Splenic infarctions may occur. In subacute and chronic cases, necrotic or 'button' ulcers may be observed in the  
 89 mucosa of the gastrointestinal tract, epiglottis and larynx, in addition to the above lesions.

90 Histopathological findings are not pathognomonic. Lesions may include parenchymatous degeneration of lymphatic  
 91 tissue, cellular proliferation of vascular interstitial tissue, and a nonsuppurative meningo-encephalomyelitis, with or  
 92 without vascular cuffing.

93 A useful critique of diagnostics and vaccination for CSF, from an authoritative source, has recently been published  
 94 (Blome *et al.*, 2006), which, as well as general guidance, also provides sources of information on validation and  
 95 scientific opinion on the applicability of certain commercial products in these areas.

96

## B. DIAGNOSTIC TECHNIQUES

97 The variability of the clinical signs and post-mortem lesions does not provide firm evidence for unequivocal  
 98 diagnosis. Other viral diseases, such as African swine fever, porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS),  
 99 and post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), thrombocytopenic purpura and various septicaemic  
 100 conditions including, amongst others, salmonellosis (especially caused by *Salmonella choleraesuis*), erysipelas,  
 101 pasteurellosis, actinobacillosis (caused by *Actinobacillus suis*) and *Haemophilus parasuis* infections may be  
 102 confused with acute CSF. In fact, these bacteria often cause concurrent infections, and isolating these pathogens  
 103 may obscure the real cause of disease, the CSF virus (CSFV). Similarly concurrent PDNS can lead to oversight of  
 104 an underlying CSF infection.

105 A tentative diagnosis based on clinical signs and post-mortem lesions must therefore be confirmed by laboratory  
 106 investigations. As pyrexia is one of the first signs of CSF and is accompanied by viraemia (Depner *et al.*, 1994),  
 107 detection of virus or viral nucleic acid in whole blood, collected in heparin or ethylene diamine tetra-acetic acid  
 108 (EDTA), or in tissues, collected from ~~a few~~ febrile animals, is the method of choice for detecting infected herds at an  
 109 early stage. This is all the more necessary in view of the serious consequences of an outbreak of CSF for trade in  
 110 pigs and pig products.

111 Laboratory methods for diagnosis of CSF are aimed at detection of the virus, viral nucleic acid or viral antigens, or  
 112 detection of specific antibodies. Targeted and risk-based sampling should be performed, random sampling only  
 113 being applied in cases where no clinical signs of disease are present. To increase the sensitivity of detection of virus,  
 114 viral antigen or nucleic acid, clinically diseased animals and febrile animals should primarily be sampled. For the  
 115 detection of antibodies, animals that have recovered from disease or animals that have been in contact with infected  
 116 or diseased animals should be primarily targeted.

117 For a correct interpretation of the test results, the inspecting veterinarian should pay particular attention to the  
 118 simultaneous and clustered occurrence of two or more of the prevailing signs of disease listed above. In suspected  
 119 primary cases an initial positive test result needs to be confirmed using a second test method. Random sampling is  
 120 unsuitable for CSF diagnosis. Additionally, whole blood samples for virus detection and reverse-transcription  
 121 polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses can be collected from a larger group of pigs.

122 CSF is subject to official control and the virus has a high risk of spread from the laboratory, consequently, a risk  
 123 analysis should be carried out to determine the level of biosecurity needed for the diagnosis and characterisation of  
 124 the virus. The facility should meet the requirements for the appropriate Containment Group as determined by the risk  
 125 assessment and as outlined in Chapter 1.1.3 *Biosafety and biosecurity in the veterinary microbiology laboratory and*  
 126 *animal facilities*. Countries lacking access to such a specialised national or regional laboratory should send  
 127 specimens to an OIE Reference Laboratory.

128 Antibodies develop in the third week of illness and persist in the surviving animal for years or even life (except for  
 129 chronic cases). Samples for antibody detection are collected in ordinary (non-heparinised) tubes from convalescent  
 130 pigs and from contact herds ~~when >more than 3 weeks have elapsed since the suspected contact with a confirmed~~  
 131 ~~outbreak took place.~~ All methods and protocols need to be validated in the respective laboratory and the laboratory  
 132 has to prove that it is capable of performing the tests it uses for diagnostic purposes with satisfactory results. If  
 133 feasible and possible, validation should be done according to OIE validation criteria.

### 134 1. Identification of the agent

#### 135 a) Immunological methods

##### 136 • Fluorescent antibody test

137 The fluorescent antibody test (FAT) is a rapid test that can be used to detect CSFV antigen in cryostat sections  
 138 of tonsils, spleen, kidney, lymph nodes or distal portions of the ileum. Tissues should be collected from several  
 139 (febrile and/or diseased) animals (Bouma *et al.*, 2001) and transported without preservatives under cool  
 140 conditions, but not frozen. Cryostat sections are stained directly with anti-CSF immunoglobulin conjugated to a  
 141 fluorescence marker such as fluorescein isothiocyanate (FITC) or indirectly using a secondary fluorescent  
 142 conjugate and examined by fluorescence microscopy. During the first stage of the infection, tonsillar tissue is  
 143 the most suitable, as this is the first to become affected by the virus irrespective of the route of infection  
 144 (Ressang, 1973). In subacute and chronic cases, the ileum is frequently positive and occasionally may be the  
 145 only tissue to display fluorescence.

146 A negative FAT result does not completely rule out CSF infection. When suspicion of CSF continues, further  
 147 samples should be obtained or attempts made at reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) or  
 148 virus isolation in cell culture. In some cases during the terminal stage of disease, neutralising antibodies can  
 149 mask a positive reaction (e.g. pig kidney [PK-15]) or another cell line of pig origin that is as sensitive and known  
 150 to be free from *Pestivirus* contamination.

151 There is a relatively high risk of false (positive and negative) results when FAT is used by laboratories not  
 152 thoroughly acquainted with the method. Thus FAT should only be used by laboratories that have experience of  
 153 using the technique, perform the technique on a routine basis and have had training in interpreting the  
 154 fluorescence.

155 • **Test procedure**

156 Include positive and negative control sections in each series of organ samples to be examined. In indirect  
 157 labelling, an infected control section should also be included, which is treated without incubation of the first  
 158 antibody. The control sections can be prepared in advance and stored after acetone fixation for 2–3 years at –  
 159 70°C until use.

160 i) Cut out a piece of tonsil, spleen, kidney and ileum of approximately 1 × 1 × 0.5 cm, and mount it with a  
 161 cryo-embedding compound or distilled water on a cryostat table.

162 ii) Freeze the piece of organ on to the cryostat table. The freezing temperature should be –15 to –20°C.  
 163 Shock-freezing of the tissue in n-Heptan cooled with liquid N<sub>2</sub> is ideal.

164 iii) Cut sections not more than 4–8 µm thick and mount these on to 40 × 32 mm-grease-free cover-slips. It is  
 165 helpful to mark these cover-slips by one cut-off corner. All sections and to are-mount them with this corner  
 166 in the same position (e.g. top right).

167 iv) Prepare several cover slips for each tissue sample.

168 v) Dry for 20 minutes at room temperature.

169 vi) After drying, fix the mounted sections for 10 minutes ~~at room temperature~~ in acetone (analytical grade) at  
 170 –20°C or air-dry for 20 minutes at 37°C.

171 vii) Immerse the sections briefly in phosphate buffered saline (PBS), remove excess fluid with tissue paper  
 172 and place them (cut off corner top right) on a frame in a humid incubation chamber. ~~humidified with a~~  
 173 ~~small volume of water placed in the bottom of the chamber.~~

174 viii) Dispense the anti-CSFV immunoglobulin at working dilution (dilution in PBS) on to the entire section and  
 175 incubate in a dark, closed chamber for 30 minutes at 37°C. Check afterwards that the conjugate solutions  
 176 have not evaporated and that the tissues have not dried out.

177 If a secondary FITC conjugate is required, wash the section five times for 2 minutes each in PBS at room  
 178 temperature, then add the FITC conjugate at working dilution and incubate as previously described.

179 ix) Wash the sections five times for 2 minutes (or three times for 5 minutes) each in PBS at room  
 180 temperature.

181 x) Immerse the section briefly in A. bidest (solvent).

182 xi) If necessary, counterstain in Evans Blue for 30 seconds.

183 xii) Remove the remaining ~~PBS fluid~~ by touching the cover-slip against tissue paper and mount the cover-slip  
 184 (with the section between cover-slip and slide) with mounting buffer on to a microscope slide.

185 xiii) Remove excess mounting fluid with tissue paper and examine the sections for fluorescence using a UV  
 186 microscope.

187 A CSFV-positive section shows brilliant ~~green~~ fluorescence in the cytoplasm of infected cells. In the tonsils,  
 188 fluorescence in the epithelial lining of the crypts is particularly evident. In kidney sections, fluorescence is most  
 189 abundant in the proximal and distal tubules of the renal cortex and the collecting ducts in the medulla. In the  
 190 ileum, fluorescence is most prominent in the epithelial cells of the Lieberkühn glands, whereas in the spleen  
 191 reactivity is more diffuse, with concentrations of lymphoid cells in the periarterial lymphoid sheath (PALS).

192 ~~The FAT involves~~ It is recommended to the use of an anti-CSFV gamma-immunoglobulins prepared from  
 193 polyclonal ~~antibody to CSFV that will not distinguish between the antigens of different pestiviruses.~~ Conjugates  
 194 used for the FAT on cryostat sections or inoculated cell cultures should be prepared from anti-CSFV gamma-  
 195 globulins raised in specific pathogen free pigs. antibodies against CSFV raised in specific pathogen free pigs.  
 196 This ensures that no minor variant viruses will be missed, but has the disadvantage that the test will not  
 197 distinguish between the antigens of different pestiviruses. Thus, pigs infected with other pestiviruses can yield a  
 198 positive result. To differentiate CSFV from other pestivirues, especially in CSFV-free areas, duplicate samples  
 199 from FAT-positive samples should be examined using monoclonal antibodies (MAbs) that can distinguish  
 200 between CSFV and other pestiviruses (especially BVDV and BDV). Alternatively, confirmatory diagnosis should  
 201 await results of RT-PCR (followed by genetic typing) or virus isolation in cell culture with subsequent typing by  
 202 MAbs.

203 Strains of modified live virus (MLV) vaccine multiply mainly in the regional lymph nodes and in the crypt  
 204 epithelium of the tonsils. Pigs vaccinated with MLV strains may yield a positive FAT for 2 weeks after  
 205 vaccination (Ogawa *et al.*, 1973; Terpstra, 1978). RT-PCR followed by nucleic acid sequencing of the RT-PCR  
 206 amplicon allows differentiation between field isolates and vaccine strains of CSFV.

207 The working dilution of the conjugates (at least 1/30) should combine a maximum brilliance with a minimum of  
 208 background. The test should only be performed on samples from freshly dead animals, as autolysis and  
 209 bacterial contamination can often result in high background staining.

210 ~~Strains of modified live virus (MLV) vaccine multiply mainly in the regional lymph nodes and in the crypt~~  
 211 ~~epithelium of the tonsils. Pigs vaccinated with MLV strains may yield a positive FAT for 2 weeks after~~  
 212 ~~vaccination (Ogawa *et al.*, 1973; Terpstra, 1978). Rabbit inoculation is used to differentiate between lapinised~~  
 213 ~~and field strains of CSFV. In contrast to field strains, lapinised strains given intravenously cause a febrile~~  
 214 ~~reaction and induce an immune response in rabbits. As nucleic acid sequencing has become available and~~  
 215 ~~more reliable, animal inoculation is no longer necessary to differentiate between field strains and vaccine~~  
 216 ~~strains of CSFV.~~

217 ~~Pigs infected with ruminant pestiviruses can give false positive FAT reactions. Congenital infections with~~  
 218 ~~ruminant Pestiviruses can cause clinical signs and pathological lesions indistinguishable from those in chronic~~  
 219 ~~CSF (Terpstra & Wensvoort, 1988b; Vannier & Carnero, 1985; Wensvoort & Terpstra, 1988). Infections by~~  
 220 ~~CSFV or ruminant pestiviruses can be differentiated by testing sera from the dam and litter mates, or from other~~  
 221 ~~contacts of an FAT-positive piglet, for neutralising antibodies to each virus. If the virus was isolated, or viral~~  
 222 ~~nucleic acid can be detected, using RT-PCR, subsequent sequencing provides a rapid and accurate tool to~~  
 223 ~~distinguish ruminant pestiviruses from CSFV. Another method of differentiating these viruses is by the~~  
 224 ~~inoculation of seronegative piglets with a suspension of suspect material, followed at least 4 weeks by virus~~  
 225 ~~neutralisation (VN) tests on their sera for the respective antibodies. However, VN tests may take several days,~~  
 226 ~~and animal inoculation methods take several weeks.~~

227 • **Immunoperoxidase procedure for differentiation of pestiviruses by monoclonal antibodies**

228 The use of a panel of three MABs that are either horseradish peroxidase (HRPO) or FITC-conjugated to a  
 229 fluorescence marker, or used in conjunction with an anti-mouse conjugate and capable of specifically detecting  
 230 all field strains of CSFV, vaccine strains of CSFV and ~~ruminant other~~ pestiviruses, respectively, would allow an  
 231 unambiguous differentiation between field and vaccine strains of CSFV on the one hand, and between CSFV  
 232 and other pestiviruses on the other (Edwards *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1986; 1989b). A prerequisite is that  
 233 the MAb against CSFV recognises all field strains and that the anti-vaccine MAB recognises all vaccine strains  
 234 used in the country. *No single MAb selectively reacts with all other ruminant pestiviruses* (Edwards *et al.*,  
 235 1991). The use of an MAB to differentiate a CSF vaccine strain can be omitted in nonvaccination areas. A  
 236 polyclonal anti-CSF immunoglobulin conjugated to HRPO serves as a positive control. Caution should be  
 237 exercised when using evidence of a single MAB as sole confirmation of an isolate as CSF.

238 Positive and negative control sections need to be included in each series of organ samples to be examined. In  
 239 the case of indirect labelling, an infected control section, which is treated without incubation of the first  
 240 antibody, should also be included. The control sections can be prepared in advance and stored after acetone  
 241 fixation for 2–3 years at –70°C until use.

242 • **Test procedure**

- 243 i) Cut eight or more cryostat sections (4–8 µm) of the FAT-positive tonsil, or another positive organ if the  
 244 tonsil is not available (as described above for the FAT method).
- 245 ii) Place Fix the sections on to ~~fixing~~ cover-slips, allow to dry for 20 minutes at room temperature and fix for  
 246 10 minutes in acetone (analytical grade) at –20°C and allow to air dry.
- 247 iii) Prepare working dilutions of the respective MAB-peroxidase conjugates in PBS + 0.01% Tween 80 + 5%  
 248 horse serum, pH 7.6. (FITC-MAB can be used as well as unconjugated MAB provided that a secondary  
 249 conjugate is used.)
- 250 iv) After rinsing with PBS, immerse the sections briefly in PBS, remove excess fluid with tissue paper and  
 251 place them (cut off corner top right) on a frame in a humid incubation chamber.
- 252 v) Overlay two sections each with the working dilution of the respective monoclonal conjugates, and two  
 253 sections with the working dilution of the polyclonal conjugate (controls).
- 254 vi) Incubate in a dark, closed chamber for 30 minutes at 37°C. Check afterwards that the solutions have not  
 255 evaporated and that the tissues have not dried out. Incubate for 1 hour at 37°C in a humid chamber.
- 256 vii) Wash the sections six times for 10 seconds each in PBS at room temperature.

- 257 viii) Stain the sections with freshly prepared chromogen–substrate solution\* for 5–15 minutes at room  
258 temperature.
- 259 ix) Rinse the sections in 0.05 M sodium acetate, pH 5.0, in distilled water and mount them on microscope  
260 slides.
- 261 x) Examine sections with a light microscope. Dark red staining of the cytoplasm of the epithelial cells lining  
262 the tonsillar crypts indicates recognition of the virus isolate by the respective conjugate, and is considered  
263 to be positive.
- 264 xi) Interpretation of the test:

Polyclonal antibody	Monoclonal antibody specific for			Interpretation
	CSF strain	CSF vaccine strain	BVD/BD strain	
+	+	–	–	CSF field strain
+	+	+	–	CSF vaccine strain
+	–	–	+	BVD/BD strain
+	–	–	–	Other non-CSF <i>Pestivirus</i> <sup>†</sup>

265 <sup>†</sup>The existence of novel strains of CSF should always be considered and any isolate from cases where CSF is still  
266 suspected should be sent to an OIE Reference Laboratory.

267 • **Antigen-capture assay**

268 For rapid diagnosis of CSF in live pigs, antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) have  
269 been developed for screening herds suspected of having been recently infected. The ELISAs are of the double-  
270 antibody sandwich type, using monoclonal and/or polyclonal antibodies against a variety of viral proteins in  
271 either serum, the blood leukocyte fraction or anticoagulated whole blood; in addition, some test kits can be  
272 used to test clarified tissue homogenates (Depner *et al.*, 1995) or serum. The technique is relatively simple to  
273 perform, does not require tissue culture facilities, is suitable for automation and can provide results within half a  
274 day. The disadvantage of being less sensitive than virus isolation, especially in adult pigs and mild or  
275 subclinical cases, may be compensated by testing all pigs of the suspect herd showing pyrexia or clinical signs  
276 of disease. However, the lowered specificity of these tests should also be taken into consideration.

277 The test is not suitable for the diagnosis of CSF in a single animal, but should only be used on herd level!

278 In any primary case, positive results must be confirmed using another test (i.e. virus isolation, RT-PCR or FAT).

279 **b) Isolation of virus**

280 Isolation of virus in cell cultures is a more sensitive but slower method for diagnosis of CSF than  
281 immunofluorescence on frozen sections. Organ preparations, leukocyte preparations, or whole blood samples  
282 can be used. Isolation is best performed in rapidly dividing PK-15 cells seeded on to cover-slips simultaneously  
283 with a 2% suspension of the tonsil in growth medium. Other pig cell lines may be used, but should be  
284 demonstrably at least as sensitive as PK-15 cells for isolation of CSFV and must be free of pestiviruses and  
285 pestivirus antibodies. It is generally advantageous to use more than one porcine cell line for inoculation, to  
286 enhance the chances of a positive result. As growth of the virus does not cause a cytopathic effect, its  
287 presence must be demonstrated by an immunostaining method, which may be carried out after one or two virus  
288 passages. This can be done by examining the cultures are examined for fluorescent foci by FAT after 24–  
289 72 hours or by immunoperoxidase staining after 4–5–3–4 days' incubation are fixed for immunoperoxidase  
290 staining. NB: Positive and negative controls always need to be included.

291 The tonsil is the most suitable organ for virus isolation from pigs that died or were killed for diagnostic  
292 purposes. Alternatively or in addition, spleen, kidney, ileum or lymph nodes can also be used.

\* **Chromogen–substrate solution**

A. Stock solution of chromogen: 0.4% 3-amino-9-ethyl carbazole; N,N-dimethyl-formamide (1 ml).

Caution **TOXIC compound**. Both chemicals are carcinogens and irritants to eyes, skin and respiratory tract.

B. 0.05 M sodium acetate, pH 5.0; 19 ml (sterile filtered through a membrane).

C. Stock solution of substrate (30% hydrogen peroxide).

Keep stock solutions A and C at 4°C in the dark and solution B at room temperature. Stock solution A can be kept at 4°C for at least 6 months and solution C for 1 year. Immediately before use, dilute 1 ml of solution A in 19 ml of solution B. Then add 10 µl of stock solution C. Mix well and stain the sections.

293 Fetal bovine serum (FBS) used in any diagnostic assay always needs to be free of pestiviruses and pestivirus  
 294 antibodies. It might not be sufficient to rely on manufacturers' declarations and for this reason it is  
 295 recommended that each lot of FBS be tested for the presence of pestiviruses and pestivirus antibodies prior to  
 296 its use in diagnostic assays.

297 A detailed procedure for virus isolation is as follows:

298 i) Prepare a 100-fold strength glutamine–antibiotic stock solution: dissolve glutamine (2.92 g) in 50 ml  
 299 distilled water (solution A) and sterilise by filtration. Dissolve each of the following antibiotics in 5–10 ml  
 300 sterile distilled water: penicillin ( $10^6$  International Units [IU]); streptomycin (1 g); mycostatin ( $5 \times 10^5$  U);  
 301 polymixin B ( $15 \times 10^4$  U); and kanamycin (1 g). Pool these solutions (solution B). Mix aseptically solutions  
 302 A and B, make up to 100 ml with sterile distilled water, and store in 5 ml aliquots at  $-20^\circ\text{C}$ . Exact antibiotic  
 303 constitution is not critical, provided sterility is achieved and cells are not affected.

304 ii) Cut 1–2 g of tissue (organ sample of approx.  $1 \text{ cm}^3$ ) into small pieces and, using a mortar and pestle or  
 305 other device, grind in a small amount of cell culture medium with sterile sand into a homogeneous paste.  
 306 Alternatively, use an appropriate crushing machine or automatic homogenisator at  $4^\circ\text{C}$ . (Attention: high  
 307 speeds can heat the sample and affect the virus!)

308 iii) Make a 20% (w/v) suspension by adding Hanks' balanced salts solution (BSS) or Hanks' minimal  
 309 essential medium (MEM); 1 ml of the glutamine–antibiotic stock is added for each 10 ml of suspension.  
 310 This mixture is held at room temperature for 1 hour.

311 iv) Centrifuge at 1000 or 2500 **g** for 15 minutes. The supernatant is used for inoculation of cell cultures. A  
 312 1/100 dilution can be processed in parallel in case of cytotoxic effects. Sterile filtration can be performed,  
 313 if considered necessary using syringe filters ( $0.45 \mu\text{m}$  followed by  $0.22 \mu\text{m}$ ).

314 v) A PK-15 monolayer is trypsinised, the cell suspension is centrifuged at 160 **g** for 10 minutes. The  
 315 supernatant is discarded and the pellet is resuspended to contain approximately  $2 \times 10^6$  cells/ml in growth  
 316 medium (Eagle's MEM with Earle's salts; 5% fetal bovine serum free of ruminant pestiviruses and  
 317 pestivirus antibodies; and 0.2 ml of the glutamine–antibiotic stock solution per 10 ml cell suspension). As  
 318 a guide, one  $75 \text{ cm}^2$  flask will give approximately 50 ml of cell suspension at the appropriate  
 319 concentration. It usually contains about  $8.5 \times 10^6$  cells.

320 Alternatively a protocol without centrifugation can be performed:

321 Growth medium is removed from a PK-15 monolayer and cells are washed once or twice with 5 ml of  
 322 adjusted trypsin/versen (ATV) solution (5 ml ATV for a 250 ml flask). ATV is removed and replaced with  
 323 fresh ATV (2 ml ATV for a 250 ml flask). The flask is incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 15 minutes or until cells are  
 324 detached. It is then filled up with cell culture medium containing 5% fetal bovine serum (8 ml medium for a  
 325 250 ml flask) and the cells are resuspended.

326 vi) Either:

327 Suspension inoculation: mix nine parts of cell suspension (from step v) and one part of supernatant fluid  
 328 (from step iv) and inoculate 1.0–1.5 ml into 6–8 Leighton tubes with cover-slips or other appropriate cell  
 329 culture flasks or plates. Three tubes are inoculated with 1.0–1.5 ml of cell suspension alone as controls.  
 330 After completion of the sample inoculations, three tubes are inoculated with CSFV as positive controls.  
 331 Careful precautions must be taken to avoid cross-contamination with this known positive virus  
 332 suspension. Negative cultures should also be prepared. Incubate at  $37^\circ\text{C}$ .

333 Or:

334 Pre-formed monolayer inoculation: for each tissue, inoculate 1.0–1.5 ml of cell suspension (prepared as in  
 335 step v) into 6–8 Leighton tubes with cover-slips or other appropriate cell culture flasks or plates. Incubate  
 336 at  $37^\circ\text{C}$  for a minimum of 4 hours and a maximum of 36 hours (until 50–80% confluency is reached). Then  
 337 drain the medium and inoculate 0.2 ml of supernatant fluid (from step iv), incubate for 1 to 2 hours at  
 338  $37^\circ\text{C}$ , rinse once with PBSM (PBS without Ca/Mg), overlay with 1 ml of growth medium and incubate at  
 339  $37^\circ\text{C}$ .

340 vii) At 1, 2 and 3 days after inoculation, two cultures, together with a positive and negative control culture are  
 341 washed twice for 5 minutes each in Hanks' BSS, Hanks' MEM or PBS and fixed with cold. Cell fixation is  
 342 performed by 100% acetone (analytical grade) for 5 minutes for cell cultures grown on glass surfaces, for  
 343 10 minutes, and stained with a direct anti-CSFV conjugate at its appropriate working dilution or indirectly,  
 344 as described in Section B.1.a.

345 If the 2% tonsil suspension proves to be toxic for the cells, then the test should be repeated using a higher  
 346 dilution or another organ. Use of the method employing pre-formed monolayers (above) will help to avoid  
 347 such.

348 viii) After washing in PBS three times for 5 minutes each, the cover-slip cultures are mounted in 90%  
 349 carbonate/bicarbonate buffered glycerol,  $\text{pH} > 8.0$ , and examined for fluorescent foci



350 viii) After fixation staining with a direct or indirect anti-CSFV conjugate at its appropriate working dilution is  
 351 performed as described in Section B.1.a. After washing in PBS three times for 5 minutes each, the cover-  
 352 slip cultures are mounted in 90% carbonate/bicarbonate buffered glycerol, pH>8.0, and examined for  
 353 fluorescent foci.

354 Instead of Leighton tubes, 6-well plates with cover-slips can be used. Alternatively, cultures growing on flat-  
 355 bottomed microtitre plates or M24-plates can also be used for virus isolation. In such case, plates are fixed and  
 356 stained as described later for the neutralising peroxidase-linked assay (NPLA; Section B.2.a).

357 ix) If the 2% tonsil suspension proves to be toxic for the cells, then the test should be repeated using a higher  
 358 dilution or another organ. Use of the method employing pre-formed monolayers (above) will help to avoid  
 359 such.

360 Whole blood (heparin or EDTA treated) from clinically diseased pigs is a suitable sample for early CSF  
 361 diagnosis. The leukocyte fraction or other components may be used, but for reasons of sensitivity simplicity the  
 362 use of whole blood is more practical and therefore preferred (De Smit *et al.*, 1994). The procedure is as follows:

- 363 i) Freeze a sample of whole blood at  $-20^{\circ}\text{C}$  and thaw in a waterbath at  $37^{\circ}\text{C}$  in order to lyse the cells.
- 364 ii) Inoculate 300  $\mu\text{l}$  haemolysed blood on to a PK-15 monolayer grown to approximately 75–50–80%  
 365 confluence\* in an M24-plate or Leighton tubes with cover slips, and allow adsorption for 1–2 hours at  
 366  $37^{\circ}\text{C}$ . Duplicate cultures of each sample should always be prepared.
- 367 ii) Remove inoculum, wash the monolayer once with Hanks' BSS or Hanks' MEM or PBSM, and add fresh  
 368 growth medium.
- 369 iv) After a further incubation period of 3–4 days at  $37^{\circ}\text{C}$  in a  $\text{CO}_2$  incubator, the plates are washed, fixed and  
 370 stained, as described later for the NPLA, using in each step a volume of 300  $\mu\text{l}$  to compensate for the  
 371 larger cell surface.

372 Note: This method is less sensitive than conventional virus isolation for the detection of acute CSF.

373 To improve the sensitivity virus isolation can be performed over two passages:

374 i) 200–300  $\mu\text{l}$  of organ preparation or blood lysate (see above) is inoculated on a cell culture tube. Always  
 375 duplicate cultures should be prepared.

376 ii) Cell cultures are incubated for  $37^{\circ}\text{C}$  for 1–2 hours, and washed twice with PBSM.

377 iii) The cultures are incubated for 72 hours at  $37^{\circ}\text{C}$  in a  $\text{CO}_2$  incubator. EMEM with 10% FBS is the ideal  
 378 medium for virus growth. Simultaneous inoculation is possible if the sample is fresh and a cytotoxic effect  
 379 is unlikely.

380 iv) The cell culture tubes or plates are frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for at least 1 hour and then thawed at room  
 381 temperature.

382 v) When using cell culture tubes, the tubes are centrifuged for 10 minutes at 778 g.

383 vi) 200–300  $\mu\text{l}$  of the supernatant is incubated for 1–2 hours on a well of a multi-dish plate or Leighton tube  
 384 as described above.

385 vii) The cell culture tubes or plates are washed with PBSM, refilled with cell culture medium and incubated for  
 386 72–96 hours in a  $\text{CO}_2$  incubator.

387 viii) Cells are fixed and stained as described in Section B.2.1.a.

388 In case a slow-growing isolate is suspected, a second passage in a culture tube can be done, leading to a third  
 389 passage in a culture dish.

390 Positive and negative controls must always be included and processed in the same way.

#### 391 • **Reverse-transcription polymerase chain reaction**

392 Many methods for RT-PCR have been described and are still being developed (McGoldrick *et al.*, 1998). This  
 393 internationally accepted method is rapid and more sensitive than antigen capture ELISAs or virus isolation  
 394 making it particularly suited to preclinical diagnosis. By using RT-PCR techniques, infected animals can be  
 395 detected early during the incubation period and also for a longer period of time in cases where the pigs recover.  
 396 RT-PCR detects viral nucleic acid only and positive results may be obtained in cases where virus isolation or

---

\* Simultaneous inoculation, though slightly more sensitive, is less suitable as the anticoagulant may interfere with the adhesion of cells on to the surface.

397 other techniques yield negative results. It is therefore more sensitive than other techniques (such as antigen-  
398 capture ELISA, and FAT).

399 Owing to its speed and sensitivity, RT-PCR is a suitable approach for screening and confirmation of suspected  
400 cases of disease and is now accepted by a number of countries and the European Union (EU) (European  
401 Commission, 2002). It is however, important to bear in mind that false positive results due to laboratory  
402 contamination can occur as well as false negative results due to inhibitors contained in the sample. Therefore,  
403 any positive results from primary outbreaks must always be confirmed by other tests. It is mandatory to include  
404 an adequate number of positive and negative controls in each run; it is also strongly recommended that internal  
405 controls be included. See Chapter 1.1.5 *Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious*  
406 *diseases*, for further details on PCR techniques. ~~The test can be applied to individual or pooled blood samples~~  
407 ~~as well as solid organs and has been used successfully to control outbreaks.~~

408 The test can be applied to blood and serum samples as well as solid organs and cell culture supernatants and  
409 has been used successfully in case of outbreaks.

410 Isolation of RNA is a critical step in RT-PCR analysis. RNA integrity is at the highest risk prior to and after  
411 extraction. Thus, treatment of samples prior to RNA extraction and storage of isolated RNA have to be carefully  
412 considered as they will influence the quality of the yielded RNA and the test result. Different methods for RNA  
413 isolation have been described and a wide variety of extraction kits is commercially available. It has to be  
414 ensured that RNA isolation is also validated in the laboratory.

415 Several conventional and real-time PCR protocols have been described (Hoffmann *et al.*, 2005; McGoldrick *et*  
416 *al.*, 1998; Paton *et al.*, 2000b; Risatti *et al.*, 2003; 2005) and a suitable protocol may be obtained from the  
417 literature or from the OIE Reference Laboratories for CSF (see Table given in Part 4 of this *Terrestrial Manual*).  
418 Evaluation of RT-PCR results can either be performed by agarose gel electrophoresis (standard RT-PCR) or by  
419 real-time techniques (RT-qPCR). Any RT-PCR protocol to be used must be thoroughly validated in each  
420 individual laboratory to show that the method is fit for purpose, before it can be used for diagnosis in that  
421 laboratory. Any RT-PCR protocol used must prove to be at least as sensitive as virus isolation. The RT-qPCR  
422 protocol described by Hoffmann *et al.* (2005) is widely used and the method yielded consistent results in  
423 international interlaboratory comparison testing.

424 In principle, pooling of samples is possible, but sensitivity must be shown to be at least as high as the  
425 sensitivity of virus isolation performed on single samples. Pooling must be properly validated prior to its use in  
426 each individual laboratory.

427 Quality control is an essential issue in PCR diagnosis and prevention of laboratory contamination is crucial.

#### 428 • **Molecular epidemiology and genetic typing**

429 The molecular epidemiology of CSF is based on the comparison of genetic differences between virus isolates.  
430 RT-PCR amplification of CSFV RNA followed by nucleotide sequencing is the simplest way of obtaining the  
431 sequence data to make these comparisons. A number of different regions of the CSFV genome may be  
432 targeted for molecular epidemiological studies (Paton *et al.*, 2000a). Two regions have been extensively  
433 studied and provide large sets of sequence data with which new isolates can be compared. One of these  
434 regions lies within the 5'-noncoding-nontranslated region (5'-NCR 5'-NTR) of the genome (150 nucleotides) and  
435 the other lies within the E2 major glycoprotein gene (190 nucleotides). In brief, the method used involves  
436 extracting virus RNA from clinical samples or infected PK-15 cell cultures infected with low passage CSFV,  
437 performing RT-PCR to amplify one or both targets within the 5'-NCR 5'-NTR or the E2 gene, and then  
438 determining the nucleotide sequence of the products and comparing with stored sequence information held in  
439 the databases (Greiser-Wilke *et al.*, 1998; Lowings *et al.*, 1996). A database of these sequences is available  
440 from the OIE Reference Laboratory for CSF (Hannover, Germany). Recent findings on analysing other  
441 relevant pestivirus sequences highlight the need for analysis of multiple regions in order to accurately type  
442 strains by this method (Becher *et al.*, 2003; Hurtado *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2009; Vilcek *et al.*, 2010). CSFV  
443 isolates from primary outbreaks should be sent to an OIE Reference Laboratory for investigation of molecular  
444 epidemiology. The receiving laboratory should be contacted first and an import permit should be obtained prior  
445 to dispatch.

## 446 2. Serological tests

447 ~~Detection of virus-specific antibodies is particularly useful on premises suspected of having infections with CSF~~  
448 ~~strains of low virulence. Due to the immunosuppressive effect of CSFV, antibodies cannot be detected with certainty~~  
449 ~~until at least 21 days post-infection. Serological investigations aimed at detecting residual foci of infection, especially~~  
450 ~~in breeding herds, may also be useful in a terminal phase of CSF eradication. In addition, antibody titres provide~~  
451 ~~valuable epidemiological information and may give hints to the entry route of the virus.~~

452 As the incidence of infection with ruminant pestiviruses may be high, particularly in breeding stock, only tests that will  
 453 discriminate between CSF and BVD/BD antibodies are useful. Virus neutralisation (VN) and the ELISA using MAbs  
 454 satisfy the requirements for sensitivity, but positive results should be confirmed by comparative VN testing.

455 Neutralisation tests are performed in cell cultures using a constant-virus/varying-serum method. As CSFV is  
 456 noncytopathic, any non-neutralised virus must be detected, after multiplication, by an indicator system. The NPLA  
 457 (Terpstra *et al.*, 1984) and the fluorescent antibody virus neutralisation (FAVN) test (Liess & Prager, 1976) are the  
 458 most commonly used techniques. Both tests can be carried out in microtitre plates. The NPLA system is now  
 459 favoured, being easier to read and having the advantage that the results can be determined by use of an inverted  
 460 light microscope, though a crude assessment of titre can be made with the naked eye.

#### 461 a) **Neutralising peroxidase-linked assay (a prescribed test for international trade)**

462 The NPLA is carried out in flat-bottomed microtitre plates. Sera can first be inactivated for 30 minutes at 56°C.  
 463 For international trade purposes, it is best to test with an initial serum dilution of 1/5 (1/10 final dilution). For  
 464 surveillance schemes within a country, a screening dilution of 1/10 (1/20 final dilution) may suffice. Appropriate  
 465 controls to ensure specificity and sensitivity of reactions are incorporated into each test.

#### 466 • **Test procedure**

467 i) Dispense dilutions of serum in growth medium (Eagle's MEM, 5% fetal bovine serum and antibiotics) in  
 468 50 µl volumes into duplicate wells of a microtitre plate. The fetal bovine serum must be free from both  
 469 BVDV and antibodies to it. A third well ~~may~~ should be included for each sample. This well contains serum  
 470 and not virus and is used as a serum control (for cytotoxicity and/or nonspecific staining).

471 ii) Add 50 µl of virus suspension to the wells, diluted in growth medium to contain approximately  
 472 100 TCID<sub>50</sub>/50 µl, and mix the contents on a microplate shaker for 20 seconds. A commonly used virus is  
 473 CSF Alfort 187 (genotype 1.1). Although there is only one CSFV serotype, it is recommended that recent  
 474 genotypes or field virus isolates circulating in the country or relevant other countries should also be used  
 475 as antibody titres can vary depending on the virus genotype used in the assay.

476 iii) Incubate the plates in a CO<sub>2</sub> incubator in a moist chamber for 1 hour at 37°C.

477 iv) Add to all wells 50 µl of growth medium containing 2 × 10<sup>5</sup> PK-15 cells/ml.

478 v) Titrate the virus dilution and incubate together with the NT plate.

479 vi) Allow the cells to grow at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> to become confluent, usually within 3–4 days.

480 vii) Discard the growth medium and rinse the plates once in 0.15 M NaCl or PBS.

481 viii) Drain the plates by blotting on a towel.

482 ix) The cell monolayers may be fixed in one of several ways:

483 • The plates are incubated for 45 minutes at 37°C, and then for at least a further 45 minutes at  
 484 –20°C. The plates are removed from the freezer, the wells are filled with 100 µl 4%  
 485 paraformaldehyde in PBS and reincubated for 5–10 minutes at room temperature. The  
 486 paraformaldehyde is discarded and the plates are rinsed with 0.15 M NaCl; or

487 • The plates are incubated at 70–80°C for 4–2–2–3 hours; or

488 • The plates are fixed with 80% acetone and incubating at 70–80°C for 1 hour; or

489 • The plates are fixed in 20% acetone in PBS for 10 minutes followed by thorough drying at 25–30°C  
 490 for 4 hours. (This can be done quickly with the aid of a hair-dryer – after 3–5 minutes complete  
 491 dryness is obtained as observed by the whitish colour of the cell monolayer.) or

492 • Plates are washed with ice-cold 99.9% ethanol and fixed with 99.9% ethanol for 45 minutes at 4°C.  
 493 (Staining should be done immediately.)

494 x) Add to each well (of a 96-well plate) 50 µl of a hyperimmune porcine CSF antiserum or monoclonal  
 495 antibody, diluted in 0.5 M NaCl containing 1% Tween 80 + 0.1% sodium azide, pH 7.6. Incubate at 37°C  
 496 for at least 15 minutes. The working dilution of the antiserum should be determined by prior titration: i.e. a  
 497 serum with an NPLA titre of 1/30,000 could be used at 1/100.

498 xi) Wash the plates five times in 0.15 M NaCl containing 1% Tween 80, pH 7.6 or PBS containing Tween and  
 499 once in distilled water.

500 xii) Add to each well 50 µl of an anti-porcine or anti-murine (as appropriate) IgG-HRPO conjugate, diluted to  
 501 its working concentration in 0.5 M NaCl with 1% Tween 80, pH 7.6, and then incubate for at least  
 502 40–15 minutes at 37°C.

503 xiii) Wash the plates five times in 0.15 M NaCl containing 1% Tween 80, pH 7.6.

- 504 xiv) Add 50 µl of chromogen–substrate solution to each well and stain for 15–30 minutes at room temperature.  
505 This solution is described in Section B.1.a Immunoperoxidase procedure for differentiation of pestiviruses  
506 by monoclonal antibodies.
- 507 xv) Discard the supernatant and wash once with 1/3 PBS/distilled water.
- 508 xvi) The test is read visually. Infected cell sheets are completely or partially stained reddish brown in the  
509 cytoplasm. The monolayer should be examined by low-power microscopy to determine the end-point of  
510 the titration. The cytoplasm of infected cells is stained dark red. Neutralisation titres are expressed as the  
511 reciprocal of the highest serum dilution that prevents virus growth in 50% of two replicate wells. The titre  
512 can be calculated according to the equation of Karber (1931)
- 513 xvii) The following controls are included in the test: cell control, positive serum and back titration of test virus.  
514 Back titration of the virus dilution added to the NT plate is to be carried out. It should cover a range of 4  
515 log dilutions and acts as an internal quality control. The back-titration should confirm that virus has been  
516 used at a concentration of between 30 and 300 TCID<sub>50</sub>/50 µl. A CSF antibody positive reference serum  
517 with known titre needs to be included. If the reference serum does not give the expected result and the  
518 back titration is out of the limit, the test has to be repeated. Reference sera should be monitored over time  
519 using internal laboratory tracking charts.
- 520 xviii) The back-titration titre is calculated using the method described by Reed & Muench (1938). The number  
521 of virus infected wells at each dilution is recorded. The cumulative infected, cumulative not infected, ratio  
522 of infected to infected + not infected and percent infected at each dilution are then determined. An  
523 example calculation is illustrated below.

<u>Log<sub>10</sub> virus dilution</u>	<u>No. infected wells</u>	<u>Cumulative infected wells (A)</u>	<u>Cumulative not infected wells (B)</u>	<u>Ratio of A/A+B</u>	<u>Per cent infected</u>
<u>0</u>	<u>6/6</u>	<u>12</u>	<u>0</u>	<u>12/12</u>	<u>100%</u>
<u>-1</u>	<u>5/6</u>	<u>6</u>	<u>1</u>	<u>6/7</u>	<u>86%</u>
<u>-2</u>	<u>1/6</u>	<u>1</u>	<u>6</u>	<u>1/7</u>	<u>27%</u>
<u>-3</u>	<u>0/6</u>	<u>0</u>	<u>12</u>	<u>0/12</u>	<u>0%</u>

524 Using the information from the above chart the 50% endpoint is calculated using the formula

525 Proportionate distance =  $(\% \text{ Positive above } 50\%) - 50\%$

526  $(\% \text{ Positive above } 50\%) - (\% \text{ Positive below } 50\%)$

527  $= 86\% - 50\% / 86\% - 27\%$

528  $= 0.61$

529 Therefore the 50% endpoint for the above example =  $(-1) + [0.6 \times (-1)] = -1.61 = 10^{1.61} = 40 \text{ TCID}_{50}/50$   
530 µl.

531 The calculation is performed according to Kärber.

532 ~~The back-titration should confirm that virus has been used at a concentration of between 30 and~~  
533 ~~300 TCID<sub>50</sub>/50 µl.~~

534 NOTE: The incubation times given above are for guidance only. Longer incubation times, with reagent dilutions  
535 optimised to such times, may be used, in order to conserve reagents.

## 536 **b) Fluorescent antibody virus neutralisation test (a prescribed test for international trade)**

537 Leighton tube method:

- 538 i) Seed a suspension of PK-15 cells at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/ml into Leighton tubes with a cover-  
539 slip.
- 540 ii) Incubate the cultures for 1–2 days at 37°C until they reach 70–80% confluency.
- 541 iii) Inactivate the sera for 30 minutes at 56°C. For international trade purposes, it is best to test with an initial  
542 serum dilution of 1/5 (1/10 final dilution).

- 543 iv) Incubate ~~the equal volumes of diluted serum and with an equal volume of a virus suspension that contains~~  
 544 200 TCID<sub>50</sub> (50% tissue culture infective dose) ~~per 0.1 ml of CSFV~~ for 1–2 hours at 37°C. Thus a constant  
 545 amount of CSFV of 100 TCID<sub>50</sub> is used for each reaction well.
- 546 v) Remove the cover-slips from the Leighton tubes, wash briefly in serum-free medium, overlay the cell  
 547 sheet with the serum/virus mixture (from step iv) and incubate for 1 hour at 37°C in a humid atmosphere.
- 548 vi) Place the cover-slip in a clean Leighton tube and incubate the cultures in maintenance medium for 2 more  
 549 days.
- 550 vii) Remove the cover-slips from the Leighton tubes, wash the monolayers twice for 5 minutes each in PBS,  
 551 pH 7.2, fix in pure acetone for 10 minutes and stain with the working dilution of the conjugate for  
 552 30 minutes at 37°C before washing.
- 553 viii) Mount the cover-slips on grease-free microscope slides with 90% carbonate/bicarbonate buffered  
 554 glycerol, pH>8.0, and examine for fluorescence.

555 When the FAVN test is performed in microtitre plates, the procedure for the NPLA (see below) can be followed  
 556 up to step viii. The plates are then stained with the working dilution of the conjugate for 30 minutes at 37°C and  
 557 examined for fluorescence. Note: When detecting fluorescence, microplates are best examined from above,  
 558 using a long focal-length objective and an inverted microscope.

559 ~~Occasionally~~ Sera from pigs infected with BVDV or BDV may show cross neutralising antibody titres that  
 560 react in the FAVN or NPLA at low dilution as if the pigs were infected with CSFV. The extent of cross-reactivity  
 561 depends on the strain of ruminant pestivirus involved and the interval between infection and time of sampling  
 562 (Wensvoort *et al.*, 1989a). ~~The usually high antibody levels reached after exposure to CSF infection, including~~  
 563 ~~strains of low virulence, allow the use of comparatively high initial dilutions in NPLA tests for CSF antibody,~~  
 564 ~~thus avoiding most, but not all, cross-reactions (Terpstra *et al.*, 1984; Terpstra & Wensvoort, 1988a).~~ In case of  
 565 continued doubt, comparative tests using a strain of CSFV, a strain of BVDV and a strain of BDV, that are  
 566 representative for the country or region, have proven useful. Comparative neutralisation tests are end-point  
 567 titrations in which the same series of twofold dilutions of the suspected serum sample is tested in duplicate  
 568 against 100 TCID<sub>50</sub> of each selected virus strain. The comparative tests are performed according to the  
 569 protocols described for the FAVN or NPLA; the cell lines used must be suitable for BVDV and BDV.  
 570 Neutralisation titres are expressed as the reciprocal of the highest serum dilution that prevents virus growth in  
 571 50% of two replicate wells. A three-fold difference or more between end-points of two titrations should be  
 572 considered decisive for an infection by the virus species yielding the highest titre. It may be necessary to use  
 573 different strains of the same genotype, and/or to test several pigs from an infected herd to obtain a definitive  
 574 result.

### 575 c) Enzyme-linked immunosorbent assay (a prescribed test for international trade)

576 Competitive, blocking and indirect techniques may be used on any suitable support and a number have been  
 577 described (e.g. Colijn *et al.*, 1997; Have, 1987; Leforban *et al.*, 1990; Moser *et al.*, 1996; Wensvoort *et al.*,  
 578 1988a). The tests used should minimise cross-reactions with BVDV, BDV and other pestiviruses. However, the  
 579 test system must ensure identification of all CSF infections, and at all stages of the immune response to  
 580 infection. Most commercially available test systems are based on the immunodominant glycoprotein E2.

581 *Antigen:* The antigen should be derived from or correspond to viral proteins of one of the recommended CSFV  
 582 strains. Cells used to prepare antigen must be free from any other *Pestivirus* infection.

583 *Antisera:* Polyclonal antisera for competitive or blocking assays should be raised in pigs or rabbits by infection  
 584 with one of the recommended CSFV strains or with the lapinised C strain. MAbs should be directed against or  
 585 correspond to an immunodominant viral protein of CSFV. Indirect assays should use an anti-porcine  
 586 immunoglobulin reagent that detects both IgG and IgM.

587 The sensitivity of the ELISA should be high enough to score positive any serum from convalescent animals, i.e.  
 588 at least 21 days post-inoculation that reacts in the neutralisation test. The ELISA may only be used with serum  
 589 or plasma samples derived from individual pigs. If the ELISA procedure used is not CSF-specific, then positive  
 590 samples should be further examined by differential tests to distinguish between CSF and other pestiviruses.

591 The complex-trapping blocking ELISA (Colijn *et al.*, 1997) is a one-step method and is suitable for use in  
 592 automated ELISA systems e.g. robots. The sera are tested undiluted. The test is fast and easy to perform, and  
 593 detects antibodies against low virulence strains of CSFV at an early stage after infection. As the MAbs are  
 594 specific for CSFV, the complex-trapping blocking ELISA will only rarely detect antibodies against BVDV,  
 595 although BDV antibodies can be more problematic. Positive sera are retested for confirmation by the NPLA or  
 596 FAVN.

597 ~~Recently, a novel ELISA has been described that uses fused protein derived from viral peptides (Lin *et al.*,~~  
598 ~~2005). The test claims to provide greater sensitivity and earlier detection of antibody than is obtained by~~  
599 ~~conventional ELISAs, but, at this time, its reactivity with antibody induced by diverse strains of CSF is not~~  
600 ~~known.~~

601 The use of marker vaccines depends on a discriminatory test able to distinguish between vaccinated and  
602 naturally infected animals. In combination with the E2 subunit vaccine, ELISAs detecting antibodies directed  
603 against the E<sup>ms</sup> protein can be used as discriminatory tests. However, commercially available E<sup>ms</sup>-specific  
604 ELISAs are less sensitive and specific than conventional CSF E2 antibody ELISAs. It is recommended to use  
605 the discriminatory tests on a herd basis and not for diagnostic analysis on samples of single animals  
606 (Anonymous, 2003; Floegel-Niesmann, 2001; Schroeder *et al.*, 2012, in print).

607 More information on commercial kits for diagnosis can be obtained from the OIE Reference Laboratories.  
608 Although commercial test kits have been thoroughly validated before licensing, each lab must perform batch  
609 control with selected (positive and negative) reference sera prior to use.

## 610 **C. REQUIREMENTS FOR VACCINES AND DIAGNOSTIC BIOLOGICALS**

611 This Section has been extensively revised and updated. Although some  
612 portions of the existing text have been incorporated, new text and deleted text  
613 have not been marked, in the interests of clarity.

### 614 **1. Background**

615 CSF has severe clinical and socio-economic consequences for pig production worldwide. The control of the disease  
616 is usually a national responsibility, and in many countries vaccination is carried out as part of a national control  
617 programme under the auspices of the veterinary authority.

618 Guidelines for the production of veterinary vaccines are given in Chapter 1.1.6 *Principles of veterinary vaccine*  
619 *production*. The guidelines given here and in chapter 1.1.6 are intended to be general in nature and may be  
620 supplemented by national and regional requirements. Varying additional requirements relating to quality, safety and  
621 efficacy will apply in particular countries or regions in order for manufacturers to obtain an authorisation or licence for  
622 a veterinary vaccine.

623 Wherever CSFV is handled, the appropriate biosecurity procedures and practices should be used. The CSF vaccine  
624 production facility should meet the requirements for containment outlined in chapter 1.1.3.

625 Modified live vaccines (MLVs) based on several attenuated virus strains (e.g. C-strain, Thiverval, PAV-250, GPE-, K-  
626 strain) are most widely used, and many of them have proven to be both safe and efficacious. In addition, E2 subunit  
627 vaccines produced in baculovirus systems are available. Inactivated whole virus vaccines are presently not  
628 available.

629 Information regarding these vaccines can be found in review publications (Blome *et al.*, 2006; Ganges *et al.*, 2008;  
630 Geiser-Wilke & Moennig, 2004; Uttenthal *et al.*, 2010; Vannie *et al.*, 2007; Van Oirschot, 2003)

631 New generations of marker vaccines are also being developed and one is in the process of licensing (Reimann *et al.*,  
632 2004).

633 Different strategies are available to differentiate infected from vaccinated animals (DIVA) by serological methods  
634 (e.g. ELISA) or genome detection methods (e.g. RT-PCR). A opinion published by the European Food Safety  
635 Authority (EFSA, 2008) demonstrated that the combination of a vaccine that uses the C-strain with RT-PCR to detect  
636 viral genome in slaughtered animals can be successfully used in a vaccination-to-live strategy (Li *et al.*, 2007; Zhao  
637 *et al.*, 2008).

638 CSF vaccines are used in different epidemiological settings and situations. Most countries free of the disease have  
639 adopted a control strategy without prophylactic vaccination but established legal provisions for emergency  
640 vaccination scenarios. In endemic situations, vaccination is mainly used to lower the impact of the disease or as a  
641 first step in an eradication programme. During epidemic incidents in otherwise free areas, emergency vaccination  
642 can be an additional tool to control and eradicate the disease.

643 Moreover, oral vaccination of affected wild boar populations may be considered. These different scenarios and the  
644 different systems of pig production may require different vaccine characteristics or may influence the focus of  
645 requirements.

646 Limited antigen and vaccine banks exist and can be used for emergency situations.

647 The optimal CSF vaccine should have the following general characteristics: short- and long-term safety for target  
648 and non-target species (especially for oral vaccines), stability, rapid induction of a stable, preferably life-long  
649 immunity, efficacy against all strains and types of field viruses, full clinical protection and protection against carrier  
650 states, prevention of horizontal and vertical transmission. Furthermore, marker vaccines will have to be accompanied  
651 by reliable discriminatory tests.

## 652 2. Outline of production and minimum requirements for conventional live vaccines

### 653 a) Characteristics of the seed

654 CSF vaccines prepared in live animals do not follow OIE animal welfare principles. Their production and use  
655 should be discontinued.

#### 656 i) *Biological characteristics of the master seed*

657 MLVs are produced from CSFV strains that have been attenuated by passage either in cell cultures or in a  
658 suitable host species not belonging to the family *Suidae*. Production is carried out in cell cultures, based  
659 on a seed-lot system.

660 Master seed viruses (MSVs) for MLVs should be selected and produced, based on their ease of growth in  
661 cell culture, virus yield and stability.

662 The exact source of the underlying CSFV isolate, its sequence, and the passage history must be  
663 recorded.

#### 664 ii) *Quality criteria*

665 Only MSVs that have been established as sterile, pure (free of extraneous agents as described in Chapter  
666 1.1.9 [Tests for sterility and freedom from contamination of biological materials](#) and those listed by the  
667 appropriate licensing authorities) and immunogenic, should be used for vaccine virus (working seed  
668 viruses and vaccine batches) production. Live vaccines must be shown not to cause disease or other  
669 adverse effects in target animals injected in accordance with chapter 1.1.6 (section on *Safety tests* [for  
670 live attenuated MSVs]).

671 Identity of the MSV has to be confirmed using appropriate methods (e.g. through the use of specific MAbs  
672 or vaccine strain-specific genome detection methods).

#### 673 iii) *Validation as vaccine strain*

674 The vaccine derived from the MSV must be shown to be satisfactory with respect to safety and efficacy.

675 Even if pigs are not known for susceptibility to transmissible spongiform encephalopathy agents (TSEs),  
676 consideration should also be given to minimising the risk of transmission by ensuring that TSE risk  
677 materials are not used as the source of the virus or in any of the media used in virus propagation.

678 The vaccine virus in the final product should generally not differ by more than five passages from the  
679 master seed lot. The commercial vaccine should be produced in batches in lyophilised form as a  
680 homogeneous product.

681 iv) Emergency procedure for provisional acceptance of new MSV in the case of an epizootic (with pathogens  
682 with many serotypes, e.g. bluetongue virus, highly pathogenic avian influenza, FMD, etc.)

683 None.

### 684 b) Method of manufacture

#### 685 i) *Procedure*

686 The virus is used to infect an established cell line. Such cell culture should be proven to be free from  
687 contaminating microorganisms and shall comply with the requirements in chapter 1.1.6.

688 Regardless of the production method, the substrate should be harvested under aseptic conditions and  
689 may be subjected to appropriate methods to release cell-associated virus (e.g. freeze-thaw cycles). The  
690 harvest can be further processed by filtration and other methods. A stabiliser may be added as  
691 appropriate. The vaccine is homogenised before lyophilisation to ensure a uniform batch/serial.

#### 692 ii) *Requirements for ingredients*

693 All ingredients used for vaccine production should be in line with requirements in chapter 1.1.6.

- 694           iii) *In-process controls*  
695           In process controls will depend on the protocol of production: they include virus titration of bulk antigen  
696           and sterility tests.
- 697           iv) *Final product batch/serial test*  
698           *Sterility*  
699           Tests for sterility and freedom from contamination of biological materials may be found in chapter 1.1.7.
- 700           *Identity*  
701           Appropriate methods (specific antibodies or specific genome detection methods) should be used for  
702           confirmation of the identity of the vaccine virus.
- 703           *Residual moisture*  
704           The level of moisture contained in desiccated products should be measured as described in chapter 1.1.6.
- 705           *Safety*  
706           Batch safety testing is to be performed unless consistent safety of the product is demonstrated and  
707           approved in the registration dossier and the production process is approved for consistency in accordance  
708           with the standard requirements referred to in chapter 1.1.6.
- 709           This final product batch safety test is conducted to detect any abnormal local or systemic adverse  
710           reactions.
- 711           For batch/serial safety testing use two healthy piglets, 6–10 weeks old, that do not have antibodies  
712           against pestiviruses. Administer to each piglet by a recommended route a tenfold dose of the vaccine.  
713           Observe the piglets daily for at least 14 days. The vaccine complies with the test if no piglet shows  
714           notable signs of disease or dies from causes attributable to the vaccine.
- 715           *Batch/ serial potency*  
716           Virus titration is a reliable indicator of vaccine potency once a relationship has been established between  
717           the level of protection conferred by the vaccine in pigs and titre of the modified live vaccine *in vitro*.
- 718           In the absence of a demonstrated correlation between the virus titre and protection, an efficacy test will be  
719           necessary (see Section C.2.c.iii).
- 720    **c) Requirements for authorisation /registration / licensing**
- 721           i) *Manufacturing process*  
722           For registration of a vaccine, all relevant details concerning preparation of MSV, manufacture of the  
723           vaccine and quality control testing (see Section C.2.a and b) should be submitted to the authorities. This  
724           information shall be provided from three consecutive vaccine batches originating from the same MSV,  
725           with a volume not less than 1/3 of the typical industrial batch volume.
- 726           The in-process controls are part of the manufacturing process.
- 727           ii) *Safety requirements*  
728           For the purpose of gaining regulatory approval, the following safety tests should be performed  
729           satisfactorily.
- 730           Vaccines should be tested for any pathogenic effects on healthy pigs, and in sows to evaluate the safety  
731           in pregnant animals and their offspring.
- 732           *Safety in young animals*  
733           Carry out the test for each recommended route of application using in each case piglets not older than the  
734           minimum age recommended for vaccination. Use vaccine virus at the least attenuated passage level that  
735           will be present in a batch of the vaccine.
- 736           Use not fewer than eight piglets of 6–8 weeks of age that do not have antibodies against pestiviruses.  
737           Administer to each piglet a quantity of the vaccine virus equivalent to not less than ten times the maximum  
738           virus titre likely to be contained in 1 dose of the vaccine. Observe the piglets daily for at least 14 days.  
739           The body temperature of each vaccinated piglet is measured on at least the 3 days preceding  
740           administration of the vaccine, at the time of administration, 4 hours after and then daily for at least  
741           14 days. The vaccine complies with the test if the average body temperature increase for all piglets does  
742           not exceed 1.50°C, no piglet shows a temperature rise greater than 1.50°C for a period exceeding 3



- 743 consecutive days, and no piglet shows notable signs of disease or dies from causes attributable to the  
744 vaccine.
- 745 Blood samples are taken at 7 days after vaccination and tested for leukopenia. The average white blood  
746 cell (WBC) count should exceed  $7 \times 10^6$  cells/ml.
- 747 In addition, the vaccines in their commercial presentation should be tested for safety in the field (see  
748 chapter 1.1.6, section on *Field tests [safety and efficacy]*).
- 749 *Safety test in pregnant sows and test for transplacental transmission*
- 750 Carry out the test with vaccination by a recommended route using not fewer than eight healthy sows or  
751 gilts of the same age and origin, between the 55th and 70th days of gestation and that do not have  
752 antibodies against pestiviruses. Use vaccine virus at the least attenuated passage level that will be  
753 present in a batch of the vaccine.
- 754 Administer to each sow a quantity of the vaccine virus equivalent to not less than the maximum virus titre  
755 likely to be contained in 1 dose of the vaccine. Clinical observation of animals is carried out daily until  
756 farrowing. Blood samples should be taken from newborn piglets before ingestion of colostrum.
- 757 The test is invalid if the vaccinated sows do not seroconvert before farrowing. The vaccine virus complies  
758 with the test if no abnormalities in the gestation or in the piglets are noted. No sow or gilt shows notable  
759 signs of disease or dies from causes attributable to the vaccine.
- 760 Vaccine virus or antibodies against CSFV must not be present in blood samples from newborn piglets.
- 761 *Non-transmissibility*
- 762 Keep together for the test not fewer than 12 healthy piglets, 6–10 weeks old and of the same origin, that  
763 do not have antibodies against pestiviruses. Use vaccine virus at the least attenuated passage level that  
764 will be present between the master seed lot and a batch of the vaccine. Administer by a recommended  
765 route to not fewer than 6 piglets a quantity of the vaccine virus equivalent to not less than the maximum  
766 virus titre likely to be contained in 1 dose of the vaccine.
- 767 Maintain not fewer than six piglets as contact controls. The mixing of vaccinated piglets and contact  
768 piglets is done 24 hours after vaccination.
- 769 After 45 days, euthanise all piglets. Carry out appropriate tests on the piglets to detect antibodies against  
770 CSFV and on the control piglets to detect CSFV in the tonsils. The vaccine complies with the test if  
771 antibodies are found in all vaccinated piglets and if no antibodies and no virus are found in the control  
772 piglets.
- 773 *Reversion-to-virulence*
- 774 The test for increase in virulence consists of the administration of the vaccine virus from the master seed  
775 lot or one or two passages above to piglets that do not have antibodies against pestiviruses.
- 776 This protocol is repeated five times. Administer to each of two healthy piglets free of antibodies to  
777 pestiviruses, 6–10 weeks old, by a recommended route, a quantity of the vaccine virus equivalent to not  
778 less than the maximum virus titre likely to be contained in 1 dose of the vaccine. Collect an appropriate  
779 quantity of blood from each piglet daily between day 2 and day 7 after administration of the vaccine virus,  
780 and pool the samples taken on the same day. Then slaughter the piglets and take the tonsils of both of  
781 them, pool the tonsils and prepare a 10% suspension in PBS, pH 7.2 kept at 4°C or at –70°C for longer  
782 storage. At the same time, the presence of CSF antigens is confirmed at each passage. Blood and pooled  
783 tonsillar tissue are used to inoculate two further pigs of the same age and origin by the same route as  
784 before.
- 785 Administer 2 ml of the pooled material (blood and tonsillar tissue) with the highest virus titre by a  
786 recommended route to each of two other piglets of the same age and origin. If no virus is found, repeat  
787 the administration once again with the same material and another two piglets. If no virus is found at this  
788 point, end the process here. If, however, virus is found, carry out a 2nd series of passages by  
789 administering 2 ml of positive material by a recommended route to each of two other piglets of the same  
790 age and origin.
- 791 Carry out this passage operation not fewer than four times (in total five groups from the start of the test  
792 should be vaccinated), verifying the presence of the virus at each passage in blood and tonsils. Care must  
793 be taken to avoid contamination by virus from previous passages.
- 794 The vaccine virus complies with the test if no indication of increasing virulence (monitored by clinical  
795 observations) of the maximally passaged virus compared with the unpassaged virus is observed.
- 796 If virus is not recovered at any passage level in the first and second series of passages, the vaccine virus  
797 also complies with the test.

- 798           iii) *Efficacy requirements*
- 799                 *Protective dose*
- 800                 Vaccine efficacy is estimated in vaccinated animals directly, by evaluating their resistance to live virus  
801                 challenge and is expressed by the number of 50% protective doses (PD<sub>50</sub>) for pigs contained in the  
802                 vaccine dose.
- 803                 The test consists of a vaccination/challenge trial in piglets aged 6–10 weeks using different dilutions of the  
804                 vaccine in question. An additional group of piglets of the same age and origin are used as controls. All  
805                 animals have to be free from antibodies against pestiviruses prior to the trial. Each group of piglets except  
806                 the control group is vaccinated with an appropriate dilution of the reconstituted vaccine (e.g. 1/40 and  
807                 1/160 using a suitable buffer solution).
- 808                 Fourteen days after the single injection of vaccine, challenge the piglets by a suitable route with a dose of  
809                 a virulent strain of CSFV that kills at least 50% of the non-vaccinated piglets in less than 21 days.  
810                 Observe the piglets for 21 days and record the body temperature 3 days before challenge and daily after  
811                 challenge for 21 days. The PD<sub>50</sub> content of the vaccine is calculated from the number of animals  
812                 protected in each group using the Spearman-Kärber method.
- 813                 The test is invalid if fewer than 50% of the control piglets display typical signs of serious infection with  
814                 swine fever virus, and die, and if fewer than 100% of the control piglets show clinical signs of disease  
815                 within the 21 days following challenge.
- 816                 The vaccine complies with the test if the minimum dose corresponds to not less than 100 PD<sub>50</sub>.
- 817                 *Protection against transplacental infection*
- 818                 Use eight sows that do not have antibodies against pestiviruses, randomly allocated to either the vaccine  
819                 group (n = 6) or the control group (n = 2).
- 820                 Between the 34<sup>th</sup> and 49<sup>th</sup> day of gestation, all sows allocated to the vaccine group are vaccinated once  
821                 with 1 dose of vaccine containing not more than the minimum titre stated on the label. Three weeks after  
822                 vaccination, all 8 sows are challenged by a suitable route with a dose of virulent strain of CSFV that would  
823                 be sufficient to kill at least 50% of non-vaccinated piglets in less than 21 days.
- 824                 Just before farrowing, the sows are euthanised and their fetuses are examined for CSFV. Serum samples  
825                 from sows and fetuses are tested for the presence of antibodies against CSFV. Isolation of CSFV is  
826                 carried out from blood of the sows (collected 7 and 9 days after challenge and at euthanasia), and from  
827                 homogenised organ material (tonsils, spleen, kidneys, lymph nodes) of the fetuses.
- 828                 The test is valid if virus is found in at least 50% of the fetuses from the control sows (excluding mummified  
829                 fetuses).
- 830                 The vaccine complies with the test if no virus is found in the blood of vaccinated sows and in fetuses from  
831                 the vaccinated sows, and antibodies against CSFV should not be found in the serum of the fetuses from  
832                 the vaccinated sows
- 833                 In addition, where appropriate, the vaccines should be tested for efficacy in the field (see chapter 1.1.6,  
834                 section on *Field tests [safety and efficacy]*).
- 835           iv) *Duration of immunity*
- 836                 As part of the authorisation procedure the manufacturer should demonstrate the duration of immunity of a  
837                 given vaccine by either challenge or the use of a validated alternative test, at the end of the claimed  
838                 period of protection.
- 839                 At least ten vaccinated pigs are each inoculated with an amount of virus corresponding to 10<sup>5</sup> PID<sub>50</sub> of a  
840                 virulent strain of CSFV and observed for 3 weeks. The vaccinated animals have to remain healthy, only  
841                 the controls should die.
- 842                 The duration of immunity after vaccination against CSF shall not be less than 6 months.
- 843           v) *Stability*
- 844                 The stability of all vaccines should be demonstrated as part of the shelf-life determination studies for  
845                 authorisation.
- 846                 The period of validity of a batch of lyophilised CSF vaccine should not be less than 1 year.

### 847 3. Requirements for other vaccines

#### 848 3.1. Oral vaccine

##### 849 3.1.1. Background

850 The most widely applied concept of oral bait vaccination of wild boar against CSF, including bait design and  
851 immunisation scheme was developed, evaluated, and optimised by Kaden *et al.* (2010). The respective vaccines are  
852 conventional modified live vaccines. Immunisation occurs by uptake of the oral vaccine through the lymphoid tissues  
853 of the oral mucosa and tonsils, where expression of virus stimulates the immune system (Kaden *et al.*, 2000; 2002;  
854 2003; 2004; Kaden & Lange, 2004; Rossi *et al.*, 2010).

855 Safety is of paramount consideration for oral vaccine use, not only for the target animals, but for the environment  
856 (see chapter 1.1.6) and other species which may come in contact with the vaccine.

##### 857 3.1.2. Outline of production and minimum requirements for vaccines

858 In addition to the outline of production described for injectable vaccines above, the following specific requirements  
859 must be met:

###### 860 a) Method of manufacture

###### 861 i) Final product batch/serial test

862 After combining all of the ingredients, the final blend contains the definitive formulation that is usually used  
863 in liquid form. The last step of production of a batch/serial is filling the final blend into blisters/ capsules to  
864 be included in baits or filling directly into the bait. This final batch/serial is tested as described for the  
865 injectable vaccines, with the following differences.

###### 866 ii) Residual moisture test

867 Does not apply if the oral vaccine is presented in liquid form

###### 868 iii) Safety

869 Administer orally by syringe to each piglet a volume corresponding to ten oral doses as indicated by the  
870 manufacturer.

###### 871 b) Requirements for authorisation/registration/licensing

872 In addition to the requirements described for injectable vaccines, the following specific requirements must be  
873 met.

###### 874 • The bait

875 The bait is an integral part of the product and should ideally meet the following criteria:

- 876 • Designed for and attractive to the target species and adapted to the mode of distribution.
- 877 • Keep its form and shape under a wide range of temperature and weather conditions
- 878 • Ingredients are non-harmful, comply with animal feed standards and should not interfere with vaccine  
879 activity
- 880 • Feature a labelling system with a public warning and identification of the product

###### 881 i) Safety requirements

882 For all the tests the liquid vaccine is administered orally with a syringe (not in the final bait formulation) to  
883 ensure that each animal receives the full dose.

###### 884 Precaution hazards

885 The release of oral vaccines in the environment shall comply with the requirements in chapter 1.1.6.

###### 886 ii) Efficacy requirements

887 Efficacy should be proven using the liquid vaccine administered by syringe to ensure that each animal  
888 receives the full dose. Proof-of-concept studies for the final formulation (vaccine integrated into bait)  
889 should be provided.

## 890 3.2. Biotechnology-based vaccines

### 891 3.2.1. Background

892 As described in Guideline 3.3 Section E *Subunit vaccines*, conventional, live attenuated CSF vaccines have a rapid  
893 onset of immunity and are effective at preventing transmission of infection (Van Oirschot, 2003), but have the  
894 disadvantage that it is not possible using serological methods (e.g. ELISA) to differentiate infected pigs from those  
895 that have merely been vaccinated. Commercial E2 subunit vaccines (Marker vaccine) have a slower onset of  
896 immunity and reduce but may not completely prevent viral shedding and transplacental infection. However, they  
897 enable a DIVA strategy to be followed thereby facilitating a 'vaccination to live' strategy.

898 The vaccine only elicits antibodies against the E2 glycoprotein and therefore antibodies against other CSFV  
899 antigens, such as the E<sup>RNS</sup> antigen, can be used as markers of infection.

### 900 3.2.2. Outline of production

#### 901 a) Characteristics of the seed

902 E2 subunit marker vaccine is prepared by the use of Baculovirus expressing the E2 antigen of CSFV. The  
903 vaccine therefore does not contain any CSFV while the baculo (vector) virus is chemically inactivated.

##### 904 i) *Biological characteristic of the master seed*

905 Production is carried out in insect cell cultures, based on a seed-lot system.

906 Selection of master seed viruses (MSVs) should ideally be based on their ease of growth in cell culture,  
907 virus yield and stability.

908 The exact source of the isolate including its sequence and passage history should be recorded.

##### 909 ii) *Quality criteria*

910 Only MSVs that have been established as sterile and pure (free of extraneous agents as described in  
911 chapter 1.1.7 and those listed by the appropriate licensing authorities), and immunogenic, shall be used  
912 for preparing the vaccine virus production.

913 Appropriate methods (specific antibodies or specific genome detection methods) should be used for  
914 confirmation of the identity of the MSV.

##### 915 iii) *Validation as vaccine strain*

916 The vaccine prepared from the MSV is shown to be satisfactory with respect to safety and efficacy for the  
917 swine for which it is intended.

918 Consideration should also be given to minimising the risk of transmission of transmissible spongiform  
919 encephalopathy agents (TSEs) by ensuring that TSE risk materials are not used as the source of the virus  
920 or in any of the media used in virus propagation.

921 The vaccine virus used to produce the final product should not differ by more than five passages from the  
922 material used for validating the seed lot. The commercial vaccine is inactivated for residual baculovirus  
923 and adjuvanted.

#### 924 b) Method of manufacture

##### 925 i) *Procedure*

926 The baculovirus is used to infect an established insect cell line. Such cell culture should be proven to be  
927 free from contaminating microorganisms and shall comply with requirements in chapter 1.1.6.

928 Regardless of the production method, the substrate should be harvested under aseptic conditions and  
929 may be subjected to appropriate methods to release cell-associated virus. The harvest can be further  
930 processed by filtration and other methods. Inactivation of residual baculovirus is performed preferably  
931 using a first order inactivant. The antigen is homogenised before formulation with adjuvant.

##### 932 ii) *Requirements for ingredients*

933 All ingredients used for vaccine production should be in line with requirements in chapter 1.1.6.

##### 934 iii) *In-process controls*

- 935 Infectivity, sterility and antigenic mass are monitored. After inactivation a test for innocuity is carried out on  
 936 every batch of antigen. The cells used to test for absence for residual live baculovirus are the same cell  
 937 line used for production or potentially equally or more sensitive cells.
- 938 iv) *Final product batch/serial test*
- 939 *Sterility*
- 940 Must comply with chapter 1.1.6.
- 941 *Identity*
- 942 The identity test is performed by a specific MAbs based virus neutralisation against CSFV or an  
 943 appropriate molecular identification. Sera prepared to be used for identity testing should not be prepared  
 944 using the homologous vaccine virus or baculovirus expressed subunit antigen but from another source.  
 945 This test may be combined with the potency test (see below).
- 946 *Safety and prove of marker concept*
- 947 Batch safety testing is to be performed unless consistent safety of the product is demonstrated and  
 948 approved in the registration dossier and the production process is approved for consistency in accordance  
 949 with the standard requirements referred to in chapter 1.1.6.
- 950 This final product batch safety test is conducted to detect any abnormal local or systemic adverse  
 951 reactions.
- 952 For batch/serial safety testing use two healthy piglets, 6–10 weeks old, that do not have antibodies  
 953 against pestiviruses. Administer to each piglet by a recommended route a double dose of the formulated  
 954 vaccine. Observe the piglets daily for at least 14 days for local and systems reactions to vaccination. After  
 955 14 days they are each injected with a second single dose of vaccine.
- 956 Any undue reaction attributable to the vaccine should be assessed and may prevent acceptance of the  
 957 batch. The vaccine should elicit antibodies against CSFV E2 but not against CSFV-E<sup>RNS</sup> antigen,
- 958 *Batch/ serial potency*
- 959 Induction of specific anti-E2 antibodies in vaccinated pigs can be used to confirm the potency of each  
 960 batch once the titre has been correlated with the results of the efficacy test.
- 961 **c) Requirements for authorisation /registration/ licensing**
- 962 i) *Manufacturing process*
- 963 See Section C.2.c.i.
- 964 ii) *Identity*
- 965 The identity test is performed by virus neutralisation using immune sera against CSFV. Sera prepared to  
 966 be used for identity testing should not be prepared using the homologous vaccine virus or baculovirus  
 967 expressed subunit antigen but from another source.
- 968 iii) *Safety requirements*
- 969 *Safety in young animals*
- 970 For the purposes of gaining regulatory approval, a trial batch of vaccine should be tested for local and  
 971 systemic toxicity by each recommended route of administration in eight piglets of 6–8 weeks of age.  
 972 Single dose and repeat dose tests using vaccines formulated to contain the maximum permitted payload  
 973 should be conducted. The repeat dose test should correspond to the primary vaccination schedule (e.g.  
 974 two injections) plus the first revaccination (i.e. a total of three injections). The animals are observed for  
 975 local and systemic reaction to vaccination for no fewer than 14 days after each injection. Any undue  
 976 reaction attributable to the vaccine should be assessed and may prevent acceptance of the vaccine. It has  
 977 to be proven that the vaccine does not elicit antibodies against CSFV-ERNS antigen,
- 978 *Safety in pregnant sows*
- 979 For the purpose of gaining regulatory approval a trial batch of vaccine should be tested for local and  
 980 systemic toxicity by each recommended route of administration corresponding to the primary vaccination  
 981 schedule (e.g. two injections) in eight pregnant sows. The sows are observed for local and systemic  
 982 reactions to vaccination. The observation period must last until parturition to examine any harmful effects  
 983 during gestation or on progeny. Any undue reaction attributable to the vaccine should be assessed and  
 984 may prevent acceptance of the vaccine. It has to be proven that the vaccine does not elicit antibodies  
 985 against CSFV-ERNS antigen,

- 986 iv) *Efficacy requirements*  
 987 *Protective dose*  
 988 Vaccine efficacy is estimated in animals vaccinated according to the manufacturer's recommendation,  
 989 following the methods described in Section C.2.c.iii.  
 990 *Protection against transplacental infection*  
 991 The trial vaccine should comply with the test described in Section C.2.c. iii.

## REFERENCES

- 992  
 993 ANONYMOUS (2003). Report on the evaluation of a new Classical swine fever discriminatory test (2003/265/EC). In:  
 994 SANCO.10809/2003. European Commission, Directorate-General for Health and Consumer Protection, Brussels, 1–  
 995 150.
- 996 BECHER P., AVALOS-RAMIREZ R., ORLICH M., CEDILLO-ROSALES S., KÖNIG M., SCHWEIZER M., STALDER H., SCHIRRMAYER H.  
 997 & THIEL H.-J. (2003). Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for  
 998 classification. *Virology*, **311**, 96–104.
- 999 BLOME S., MEINDL-BOHMER A., LOEFFEN W., THUER B. & MOENNIG V. (2006). Assessment of classical swine fever  
 1000 diagnostics and vaccine performance. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **25**, 1025–1038.
- 1001 BOUMA A., STEGEMAN J.A., ENGEL B., DE KLUIJVER E.P., ELBERS A.R. & DE JONG M.C. (2001). Evaluation of diagnostic  
 1002 tests for the detection of classical swine fever in the field without a gold standard. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 383–  
 1003 388.
- 1004 COLIJN E.O., BLOEMRAAD M. & WENSVOORT G. (1997). An improved ELISA for the detection of serum antibodies  
 1005 directed against classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.*, **59**, 15–25.
- 1006 DEPNER K., GRUBER A. & LIESS B. (1994). Experimental infection of weaner pigs with a field isolate of HC/CSF virus  
 1007 derived from a recent outbreak in Lower Saxony. I: Clinical, virological and serological findings. *Wien. Tierarztl.*  
 1008 *Monatsschr.*, **81**, 370–373.
- 1009 DEPNER K., PATON D.J., CRUCIERE C., DE MIA G.M., MULLER A., KOENEN F., STARK R. & LIESS B. (1995). Evaluation of  
 1010 the enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid screening and detection of classical swine fever virus antigens  
 1011 in the blood of pigs. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **14**, 677–689.
- 1012 ~~DEPNER K.R., BOUMA A., KOENEN F., KLINKENBERG D., LANGE E., DE SMIT H. & VANDERHALLEN H. (2001). Classical swine~~  
 1013 ~~fever (CSF) marker vaccine. Trial II. Challenge study in pregnant sows. *Vet. Microbiol.*, **83**, 107–120.~~
- 1014 DE SMIT A.J., TERPSTRA C. & WENSVOORT G. (1994). Comparison of Viral Isolation Methods from Whole Blood or  
 1015 Blood Components for Early Diagnosis of CSF. Rep. Meeting Nat. Swine Fever Lab. Brussels 24–25 November.  
 1016 Commission of the European Communities, DGVI/5848/95, 21–22.
- 1017 EDWARDS S., MOENNIG V. & WENSVOORT G. (1991). The development of an international reference panel of  
 1018 monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestiviruses. *Vet. Microbiol.*, **29**, 101–  
 1019 108.
- 1020 ~~EUROPEAN COMMISSION (1997). The Use of Marker Vaccines in the Control of Infectious Diseases in Particular,~~  
 1021 ~~Classical Swine Fever. Report Sci. Vet. Comm. Commission of the European Communities, DGVI, BII2, doc~~  
 1022 ~~VI/8419, 1–13.~~
- 1023 EUROPEAN COMMISSION (2002). Commission decision of 1 February 2002 approving a Diagnostic Manual establishing  
 1024 diagnostic procedures, sampling methods and criteria for evaluation of the laboratory tests for the confirmation of  
 1025 classical swine fever (2002/106/EC). *Official Journal of the European Union*, L39/71.
- 1026 ~~EUROPEAN COMMISSION (2003). Commission decision of 5 December 2003 amending Decision 2002/106/EC as~~  
 1027 ~~regards the establishment of a classical swine fever discriminatory test. (2003/859/EC). *Official Journal of the*~~  
 1028 ~~*European Union*, L324/55.~~
- 1029 EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA): Annex to *The EFSA Journal* (2008) **932**, 1–18 and **933**, 1–16. Page 31.
- 1030 FLOEGEL-NIESMANN G. (2001). Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial III. Evaluation of discriminatory  
 1031 ELISAs. *Vet. Microbiol.*, **83**, 121–136.

- 1032 GANGES L., NÚÑEZ J.I., SOBRINO F., BORREGO B., FERNÁNDEZ-BORGES N., FRÍAS-LEPOUREAU M.T. & RODRÍGUEZ F.  
 1033 (2008). Recent advances in the development of recombinant vaccines against classical swine fever virus: Cellular  
 1034 responses also play a role in protection. *Science Direct*, **177**, 169–177.
- 1035 GREISER-WILKE I., DEPNER K., FRITZEMEIER J., HAAS L. & MOENNIG V. (1998). Application of a computer program for  
 1036 genetic typing of classical swine fever virus isolates from Germany. *J. Virol. Methods*, **75** (2), 141–150.
- 1037 GREISER-WILKE I. & MOENNIG V. (2004). Vaccination against classical swine fever virus: limitations and new  
 1038 strategies. *Animal Health Res. Rev.*, **5** (2), 223–226.
- 1039 HAVE P. (1987). Use of enzyme-linked immunosorbent assays in diagnosis of viral diseases in domestic livestock.  
 1040 *Arch. Experimentelle Veterinärmedizin*, **41**, 645–649.
- 1041 HOFFMANN B., BEER M., SCHELP C., SCHIRRMIEIER H. & DEPNER K. (2005). Validation of a real-time RT-PCR assay for  
 1042 sensitive and specific detection of classical swine fever. *J. Virol. Methods*, **130**, 36–44.
- 1043 HURTADO A., GARCIA-PEREZ A.L., ADURIZ G. & JUSTE R.A. (2003). Genetic diversity of ruminant pestiviruses from  
 1044 Spain. *Virus Res.*, **92**, 67–73.
- 1045 KADEN V., LANGE E., KÜSTER H., MÜLLER T. & LANGE B. (2010). An update on safety studies on the attenuated  
 1046 “RIEMSER Schweinepestoralvakzine” for vaccination of wild boar against classical swine fever. *Vet. Microbiol.*, **143**  
 1047 (2–4), 133–138. Epub 2009 Nov 24. PubMed PMID: 20022716.
- 1048 KADEN V., LANGE E., RIEBE R. & LANGE B. (2004). Classical swine fever virus Strain ‘C’. How long is it detectable after  
 1049 oral vaccination? *J. Vet. Med. [B] Infect. Dis. Vet. Public Health*, **51** (6), 260–262. PubMed PMID: 15458487.
- 1050 KADEN V., RENNER C., ROTHE A., LANGE E., HÄNEL A. & GOSSGER K. (2003). Evaluation of the oral immunisation of wild  
 1051 boar against classical swine fever in Baden-Württemberg. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, **116** (9–10), 362–  
 1052 367. PUBMED PMID: 14526465.
- 1053 KADEN V., HEYNE H., KIUPEL H., LETZ W., KERN B., LEMMER U., GOSSGER K., ROTHE A., BÖHME H. & TYRPE P. (2002).  
 1054 Oral immunisation of wild boar against classical swine fever: concluding analysis of the recent field trials in Germany.  
 1055 *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, **115** (5–6), 1793685. PubMed PMID: 12058591.
- 1056 KADEN V., LANGE E., FISCHER U. & STREBELOW G. (2000). Oral immunisation of wild boar against classical swine fever:  
 1057 valuation of the first field study in Germany. *Vet. Microbiol.*, **73** (2363), 239–252. PubMed PMID: 10785331.
- 1058 KADEN V. & LANGE E. (2004). Development of maternal antibodies after oral vaccination of young female wild boar  
 1059 against classical swine fever. *Vet. Microbiol.*, **103** (1–2), 115–119. PubMed PMID: 15381274.
- 1060 KÄRBER G. (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv für Exp.*  
 1061 *Pathol. u. Pharmakologie*, **162**, 480–483.
- 1062 LANGEDIJK J.P., MIDDEL W.G., MELOEN R.H., KRAMPS J.A. & DE SMIT J.A. (2001). Enzyme-linked immunosorbent assay  
 1063 using a virus type-specific peptide based on a subdomain of envelope protein E(ns) for serologic diagnosis of  
 1064 pestivirus infections in swine. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 906–912.
- 1065 LEFORBAN Y., EDWARDS S., IBATA G. & VANNIER P. (1990). A blocking ELISA to differentiate hog cholera virus  
 1066 antibodies in pig sera from those due to other pestiviruses. *Ann. Rech. Vet.*, **21**, 119–129.
- 1067 LI Y., ZHAO J.-J., LI N., SHI Z., CHENG D., ZHU Q.-H., TU C., TONG G.-Z. & QIU H.-J. (2007). A multiplex nested RT-PCR  
 1068 for the detection and differentiation of wild-type viruses from C-strain vaccine of classical swine fever virus. *J. Virol.*  
 1069 *Methods*, **143** (1), 16–22.
- 1070 LISS B. & PRAGER D. (1976). Detection of neutralising antibodies (NIF) test: use of new technical equipment for  
 1071 laboratory swine fever diagnosis. In: CEC Seminar on Diagnosis and Epizootiology of Classical Swine Fever. EUR  
 1072 5486, 187–197.
- 1073 LIN M., TROTTER E. & MALLORY M. (2005). Enzyme-linked immunosorbent assay based on a chimeric antigen bearing  
 1074 antigenic regions of structural proteins Erns and E2 for serodiagnosis of classical swine fever virus infection. *Clin.*  
 1075 *Diagn. Lab. Immunol.*, **12**, 877–881.
- 1076 LIU L., XIA H., WAHLBERG N., BELAK S. & BAULE C. (2009). Phylogeny, classification and evolutionary insights into  
 1077 pestiviruses. *Virology*, **385** (2), 351–357.

- 1078 LOWINGS P., IBATA G., NEEDHAM J. & PATON D. (1996). Classical swine fever virus diversity and evolution. *J. Gen. Virol.*, **77**, 1311–1321.  
1079
- 1080 MCGOLDRICK A., LOWINGS J.P., IBATA G., SANDS J.J., BELAK S. & PATON D.J. (1998). A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (Taq Man). *J. Virol. Methods*, **72**, 125–135.  
1081
- 1082 MOSER C., RUGGLI N., TRATSCHIN J.D. & HOFMANN M.A. (1996). Detection of antibodies against classical swine fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glycoprotein E2. *Vet. Microbiol.*, **51**, 41–53.  
1083
- 1084 OGAWA N., NAKAGAWA H., YAMAMOTO H., SAWADA M., HANAOKA T. & SAZAWA H. (1973). Viral detection in pigs inoculated with the GPE-strain of hog cholera attenuated virus. *Ann. Rep. Nat. Vet. Assay Lab. (Japan)*, **10**, 15–19.  
1085
- 1086 PATON D.J., MCGOLDRICK A., GREISER-WILKE I., PARCHARIYANON S., SONG J.-Y., LIU P.P., STADEJEK T., LOWINGS J.P., BJORKLUND H. & BELAK S. (2000a). Genetic typing of classical swine fever. *Vet. Microbiol.*, **73**, 137–157.  
1087
- 1088 PATON D.J., MCGOLDRICK A., BENSUADE E., BELAK S., MITTELHOLZER C., KOENEN F., VANDERHALLEN H., GREISER-WILKE I., SCHEIBNER H., STADEJEK T., HOFMANN M. & THUER B. (2000b). Classical swine fever virus: a second ring test to evaluate RT-PCR detection methods. *Vet. Microbiol.*, **77**, 71–81.  
1089  
1090
- 1091 REED L.J., & MUENCH H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hygiene*, **27** (3), 493–497.  
1092
- 1093 REIMANN I., DEPNER K., TRAPP S. & BEER M. (2004). An avirulent chimeric *Pestivirus* with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus. *Vaccine*, **322**, 143–157.  
1094
- 1095 RESSANG A.A. (1973). Studies on the pathogenesis of hog cholera. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **20**, 256–271
- 1096 RISATTI G.R., CALLAHAN J.D., NELSON W.M. & BORCA M.V. (2003). Rapid detection of classical swine fever virus by a portable real-time reverse transcriptase PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, **41** (1), 500–505.  
1097
- 1098 RISATTI G., HOLINKA L., LU Z., KUTISH G., CALLAHAN J.D., NELSON W.M., BREA TIO E. & BORCA M.V. (2005). Diagnostic evaluation of a real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of classical swine fever virus. *J. Clin. Microbiol.*, **43** (1), 468–471.  
1099  
1100
- 1101 ROSSI S., POL F., FOROT B., MASSE-PROVIN N., RIGAUX S., BRONNER A. & LE POTIER M.F. (2010). Preventive vaccination contributes to control classical swine fever in wild boar (*Sus scrofa* sp.). *Vet. Microbiol.*, **142** (1–2), 99–107. Epub 2009 Oct 3. PubMed PMID: 19854007.  
1102  
1103
- 1104 SCHROEDER S., VON ROSEN T., BLOME S., LOEFFEN W., HAEGEMANN A., KOENEN F. & UTTENTHAL Å. (2012). Evaluation of classical swine fever virus antibody detection assay with an emphasis on the differentiation of infected from vaccinated animals. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **31** (3), 997–1010.  
1105  
1106
- 1107 TERPSTRA C. (1978). Detection of C-strain virus in pigs following vaccination against swine fever. *Tijdschr. Diergeneesk.*, **103**, 678–684.  
1108
- 1109 TERPSTRA C., BLOEMRAAD M. & GIELKENS A.J.L. (1984). The neutralising peroxidase-linked assay for detection of antibody against swine fever virus. *Vet. Microbiol.*, **9**, 113–120.  
1110
- 1111 ~~TERPSTRA C. & WENSVOORT G. (1988a). The protective value of vaccine-induced neutralising antibody titres in swine fever. *Vet. Microbiol.*, **16**, 123–128.~~  
1112
- 1113 TERPSTRA C. & WENSVOORT G. (1988b). Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. *Res. Vet. Sci.*, **45**, 137–142.  
1114
- 1115 UTTENTHAL A., LE POTIER M.F., ROMERO L., DE MIA G.M. & FLOEGEL NIESMANN G. (2001). Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial I. Challenge studies in weaner pigs. *Vet. Microbiol.*, **83**, 85–106.  
1116
- 1117 UTTENTHAL A., PARIDA S., RASMUSSEN T.B., PATON D.J., HAAS B. & DUNDON W.G. (2010). Strategies for differentiating infection in vaccinated animals (diva) for foot-and-mouthdisease, classical swine fever and avian influenza. *Expert. Rev. Vaccines*, **9** (1), 73–87. Review. PubMed PMID: 20021307.  
1118  
1119
- 1120 Van Oirschot J.T. (2003). Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet. Microbiol.*, **96**, 367–384.
- 1121 VANNIE P., CAPUA I., LE POTIER M.F., MACKAY D.K., MUYLKENS B., PARIDA S., PATON D.J. & THIRY E. (2007). Marker vaccines and the impact of their use on diagnosis and prophylactic measures. *Rev. Sci. Tech.*, **26** (2), 351–372. Review. PubMed PMID: 17892157.  
1122  
1123



- 1124 VANNIER P. & CARNERO R. (1985). Effets pour le porc d'un virus propagé par un vaccin contre la maladie d'Aujeszky.  
1125 *Point Vet.*, **17**, 325–331.
- 1126 VILCEK S., WILLOUGHBY K., NETTLETON P. & BECHER P. (2010). Complete genomic sequence of a border disease virus  
1127 isolated from Pyrenean chamois. *Virus Res.*, **152** (1–2), 164–168.
- 1128 WENSVOORT G., BLOEMRAAD M. & TERPSTRA C. (1988a). An enzyme immunoassay employing monoclonal antibodies  
1129 and detecting specifically antibodies to classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.*, **17**, 129–140.
- 1130 WENSVOORT G. & TERPSTRA C. (1988b). Bovine viral diarrhoea infections in piglets born from sows vaccinated against  
1131 swine fever with contaminated vaccine. *Res. Vet. Sci.*, **45**, 143–148.
- 1132 WENSVOORT G., TERPSTRA C., BOONSTRA J., BLOEMRAAD M. & VAN ZAANE D. (1986). Production of monoclonal  
1133 antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Vet. Microbiol.*, **12**, 101–108.
- 1134 WENSVOORT G., TERPSTRA C., DE KLUYVER E.P (1989a). Characterization of porcine and some ruminant pestiviruses  
1135 by cross-neutralisation. *Vet. Microbiol.*, **20**, 291–306.
- 1136 WENSVOORT G., TERPSTRA C., DE KLUYVER E.P., KRAGHTEN C. & WARNAAR J.C. (1989b). Antigenic differentiation of  
1137 pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus. *Vet. Microbiol.*, **21**, 9–20.
- 1138 ZHAO J.J., CHENG D., LI N., SUN Y., SHI Z., ZHU Q.H., TU C., TONG G.Z. & QIU H.J. (2008). Evaluation of a multiplex real-  
1139 time RT-PCR for quantitative and differential detection of wild-type viruses and C-strain vaccine of Classical swine  
1140 fever virus. *Vet. Microbiol.*, **126**, (1–3), 1–10.
- 1141 \*
- 1142 \* \*
- 1143 **NB:** There are OIE Reference Laboratories for Classical swine fever  
1144 (see Table in Part 4 of this *Terrestrial Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list:  
1145 <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/> ).  
1146 Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on  
1147 diagnostic tests, reagents and vaccines for classical swine fever



**REUNIÓN DEL GRUPO DE LA MESA AMPLIADA DE LA COMISIÓN DE NORMAS BIOLÓGICAS DE LA OIE  
París, 18–19 de febrero de 2013**

**Estado de los capítulos identificados para actualización y propuesta de aprobación en 2013**

No.	Título del capítulo	Texto de los expertos	Recomendación del GMA	Decisión de la CNB
1.1.1	Recogida de muestras para el diagnóstico	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final	Aprobado
1.1.2	Envío de especímenes de origen animal	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final	Aprobado
1.1.3	Norma sobre el riesgo biológico en los laboratorios veterinarios y en las instalaciones para animales	<b>RECIBIDO</b>	Recomendó que la CNB contemplase proponer al DG convocar de nuevo al GAH para que estudie los comentarios sobre este capítulo y la directriz 3.5 con miras a volver a redactar el capítulo. Suprimir de los capítulos sobre enfermedades la mención sobre evaluación de riesgos.	Aprobó convocar GAH, enviar material previamente.
1.1.5	Principios y métodos de validación para las pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final	Aprobado.
1.1.6	Principios de producción de vacunas veterinarias (transformar en norma)	Será redactado por un GAH	Texto pendiente de recepción	
1.1.10	Normas internacionales para bancos de vacunas	Texto pendiente de recepción	Texto pendiente de recepción	
2.1.3	Lengua azul	Se recibió la primera versión	Capítulo recibido pero pendiente de revisión	
2.1.4x	Fiebre hemorrágica Crimea-Congo	<b>RECIBIDO</b>	Texto excesivamente orientado al ser humano. Deberá ser revisado desde el punto de vista de sanidad animal, e incluir información sobre la situación en Europa. ¿Son necesarias tres pruebas serológicas? ¿Cuándo y con qué fin se emplean en animales? Contactar al centro colaborador de CIRAD.	Aprobado
	Enfermedad hemorrágica epizootica	Texto pendiente de recepción	Capítulo recibido pero pendiente de revisión	
2.1.4	Equinococosis/hidatidosis	Texto pendiente de recepción	Texto pendiente de recepción	
2.1.6	Cowdriosis (hidrocarditis)	Texto pendiente de recepción	Texto pendiente de recepción	
2.1.8	Leishmaniosis	Texto pendiente de recepción	Capítulo recibido pero pendiente de revisión	

No.	Título del capítulo	Texto de los expertos	Recomendación del GMA	Decisión de la CNB
2.1.10.	Gusano barrenador ( <i>Cochliomyia hominivorax</i> y <i>Chrysomya bezziana</i> )	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final	Aprobado
2.1.11.	Paratuberculosis (enfermedad de Johne)	Texto pendiente de recepción	Texto pendiente de recepción	
2.1.13.	Rabia (sección vacunas)	<b>RECIBIDO</b> del GAH sobre calidad vacunas	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final	Aprobado
2.1.14.	Fiebre del Valle del Rift	<b>RECIBIDO</b> el capítulo del GAH	Capítulo recibido	Aprobó el informe del GAH y enviar el proyecto de texto a los PPMM para una primera ronda de comentarios
2.1.20.	Fiebre del Nilo Occidental	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final si los autores aclaran varios puntos.	Aprobado
2.2.1	Acaraposis de las abejas melíferas	El GAH está revisando todos los capítulos sobre abejas (coordinador: Ritter). Todavía no ha sido recibido	Texto pendiente de recepción	
2.2.2.	Loque americana de las abejas melíferas	Texto pendiente de recepción	Texto pendiente de recepción	
2.2.3.	Loque europea de las abejas melíferas	Texto pendiente de recepción	Texto pendiente de recepción	
2.2.4.	Nosemosis de las abejas melíferas	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final si los autores aclaran un punto.	Aprobado
2.2.5.	Infestación por el escarabajo de las colmenas ( <i>Aethina tumida</i> )	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final	Aprobado
2.2.6.	Infestación de las abejas melíferas por los ácaros <i>Tropilaelaps</i> ( <i>Tropilaelaps</i> spp.)	Texto pendiente de recepción	Texto pendiente de recepción	
2.2.7.	Varroosis de las abejas melíferas	Texto pendiente de recepción	Texto pendiente de recepción	
2.3.2.	Bronquitis infecciosa aviar	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final si los autores aclaran varios puntos.	Aprobado
2.3.5.	Micoplasmosis aviar ( <i>M. gallisepticum</i> , <i>M. synoviae</i> )	Texto pendiente de recepción	Texto pendiente de recepción	

No.	Título del capítulo	Texto de los expertos	Recomendación del GMA	Decisión de la CNB
2.3.9.	Cólera aviar	Se recibió la primera versión, pero la sección sobre vacunas no se modificó	Se recibió la sección sobre diagnóstico. En espera de revisión de la sección sobre vacunas	
2.3.10.	Viruela aviar	Texto pendiente de recepción	Texto pendiente de recepción	
2.3.12.	Bursitis infecciosa (Enfermedad de Gumboro)	Texto pendiente de recepción	Texto pendiente de recepción	
2.4.5.	Campilobacteriosis genital bovina	Solicitado su traslado a 2014	Texto pendiente de recepción	
2.4.8.	Diarrea viral bovina	Texto pendiente de recepción	Texto pendiente de recepción	
2.4.9.	Perineumonía contagiosa bovina	Texto pendiente de recepción	Capítulo recibido pero pendiente de revisión	
2.4.15.	Fiebre catarral maligna	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final	Aprobado
2.4.16.	Telleriosis	Texto pendiente de recepción	Capítulo recibido pero pendiente de revisión	
2.4.18.	Tripanosomosis (transmitida por la mosca tse-tsé)	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final si los autores aclaran varios puntos.	Aprobado
2.5.3.	Durina	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final	Aprobado
2.5.5.	Encefalomiелitis equina (del Este y del Oeste)	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final	Aprobado
2.5.6.	Anemia infecciosa equina	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final	Aprobado
2.5.8.	Piroplasmosis equina	Texto pendiente de recepción	Capítulo recibido pero pendiente de revisión	
2.5.9.	Rinoneumonía equina	Se recibió la primera versión, pero la sección sobre vacunas no se modificó	Se recibió la sección sobre diagnóstico. En espera de revisión de la sección sobre vacunas	Aprobado
2.5.10.	Arteritis viral equina	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final	Aprobado
2.5.11.	Muermo	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final	Aprobado
2.5.13.	Encefalomiелitis equina venezolana	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final	Aprobado

No.	Título del capítulo	Texto de los expertos	Recomendación del GMA	Decisión de la CNB
2.6.1.	Mixomatosis	Texto pendiente de recepción	Texto pendiente de recepción	
2.7.5.	Agalaxia contagiosa	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviar la sección sobre diagnóstico a los PPMM como versión final si los autores aclaran un punto. Sección C pendiente	Aprobado
2.7.10.	Adenocarcinoma pulmonar ovino (adenomatosis)	Texto pendiente de recepción	Capítulo recibido pero pendiente de revisión	
2.7.11.	Peste de los pequeños rumiantes	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final si los autores aclaran varios puntos.	Aprobado
2.8.3.	Peste porcina clásica (cólera del cerdo)	La sección sobre vacunas fue enviada por el GAH en 2013	La sección sobre vacunas fue recibida	Aprobó el informe del GAH y enviar el proyecto de texto para la sección sobre vacunas a los PPMM para una primera ronda de comentarios
2.8.9.	Enfermedad vesicular porcina	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final si los autores aclaran varios puntos.	Aprobado
2.9.1.	Enfermedades bunyavirales de los animales (excluyendo la Fiebre del Valle del Rift)	<b>RECIBIDO</b>	Recibió una de las tres revisiones, las otras dos están pendientes	
2.9.2.	Viruela del camello	<b>RECIBIDO</b>	Capítulo recibido pero pendiente de revisión	
2.9.4.	Criptosporidiosis	Texto pendiente de recepción	Texto pendiente de recepción	
2.9.5.	Cisticercosis	Texto pendiente de recepción	Texto pendiente de recepción	
2.9.7.	<i>Listeria monocytogenes</i>	Texto pendiente de recepción	Texto pendiente de recepción	
2.9.8.	Sarna	<b>RECIBIDO</b>	Aprobó enviarlo a los PPMM como versión final y pedir imágenes a los autores	Aprobado
2.9.11.	<i>Escherichia coli</i> verocitotoxigénica	Texto pendiente de recepción	Texto pendiente de recepción	

**Capítulos nuevos y capítulos cuya actualización se propone para 2014**

No.	Título
Capítulo nuevo	Gestión de laboratorios veterinarios (incluirá secciones sobre la gestión de la calidad y del riesgo biológico)
1.1.8	Requisitos mínimos para las instalaciones de producción de vacunas
1.1.9	Control de calidad de las vacunas
1.1.6.	Principios de producción de vacunas veterinarias (transformar en norma)
2.1.9.	Leptospirosis
2.1.19.	Estomatitis vesicular
2.3.3.	Laringotraqueítis infecciosa aviar
2.3.6.	Tuberculosis aviar
2.4.3.	Brucelosis bovina
2.4.5.	Campilobacteriosis genital bovina
2.4.10.	Dermatofilosis
2.5.4.	Linfangitis epizoótica
2.7.2.	Brucelosis caprina y ovina (no debida a <i>Brucella ovis</i> )
2.7.6.	Pleuroneumonía contagiosa caprina
2.7.9.	Epididimitis ovina ( <i>Brucella ovis</i> )
2.8.5.	Brucelosis porcina
2.8.10.	Encefalomiелitis por teschovirus (anteriormente encefalomiелitis por enterovirus o enfermedades de Teschen/Talfan)
2.9.10.	Toxoplasmosis

Fueron añadidos los tres capítulos siguientes a esta lista:

2.4.1.	Anaplasmosis bovina
2.4.2.	Babesiosis bovina
2.4.16.	Teileriosis (este texto ya ha sido recibido)

**REUNIÓN DEL GRUPO DE LA MESA AMPLIADA DE LA  
COMISIÓN DE NORMAS BIOLÓGICAS DE LA OIE  
París, 18–19 de febrero de 2013**

---

**1. Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres**

- 1.1. Avance desde la última reunión
- 1.2. Revisión de los capítulos cuya aprobación será propuesta en mayo de 2013: textos enviados para la primera ronda de comentarios (opinión y recomendaciones)
- 1.3. Estado de los capítulos identificados para ser revisados y proponer su aprobación en 2014
- 1.4. Pregunta de la Comisión del Código sobre las pruebas para primates no humanos
- 1.5. ¿La prueba por reacción de polimerasa en cadena está validada suficientemente para ser prescrita para la metritis contagiosa equina?
- 1.6. Pruebas prescritas y de sustitución – propuesta de suprimirlas (información y opinión)

Para información: informe del Grupo *ad hoc* sobre calidad de las vacunas relacionadas con la peste porcina clásica y texto propuesto para el Manual

**2. Resultado: recomendaciones del Grupo de la Mesa Ampliada a la Comisión de Normas Biológicas (tabla del punto 1.2 adaptada en función de la discusión)**

---



**REUNIÓN DEL GRUPO DE LA MESA AMPLIADA DE LA  
COMISIÓN DE NORMAS BIOLÓGICAS DE LA OIE  
París, 18–19 de febrero de 2013**

**Lista de participantes**

**MESA DE LA COMISIÓN DE NORMAS BIOLÓGICAS**

<p><b>Prof. Vincenzo Caporale</b> (<i>Presidente</i>) Colleaterrato Alto 64100 Teramo ITALIA Tel: (+39-348) 79.78.711 <a href="mailto:v.caporale@oie.int">v.caporale@oie.int</a></p>	<p><b>Dr. Hualan Chen</b> (<i>Vicepresidente</i>) National Avian Influenza Reference Laboratory, Animal Influenza Laboratory of the Ministry of Agriculture, Harbin Veterinary Research Institute, CAAS 427 Maduan Street, Harbin 150001 CHINA (REP. POP.) Tel.: (86-451) 8593.5079 Fax: (86-451) 8273.3132 <a href="mailto:hlchen1@yahoo.com">hlchen1@yahoo.com</a></p>	<p><b>Dr. Rodolfo C. Rivero</b> (<i>Vicepresidente</i>) Coordinador nacional EET, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección de Laboratorios Veterinarios Director de Laboratorio Regional “Miguel C. Rubino”, C.C. 57037 C.P. 6000 Paysandú URUGUAY Tel (598) 72.25229 o 27871 Fax (598) 72.27614 <a href="mailto:rrivero@mgap.gub.uy">rrivero@mgap.gub.uy</a></p>
--	--	--

**PARTICIPANTES INVITADOS**

<p><b>Prof. Steven Edwards</b> Redactor consultor del <i>Manual Terrestre</i>, c/o OIE 12 rue de Prony 75017 París, FRANCIA Tel.: (33-1) 44.15.18.88 Fax: (33-1) 42.67.09.87 <a href="mailto:steve-oie@cabanas.waitrose.com">steve-oie@cabanas.waitrose.com</a></p>	<p><b>Dr. Moritz Klemm,</b> Comisión Europea, Dirección General de Salud y Consumo, Dirección G Asuntos Veterinarios e Internacionales, Unidad G.2 Sanidad Animal, 101 Rue Froissart, B - 1040 Bruselas, BÉLGICA Tel: (32-2) 295.10.16 Fax: (32-2) 295.31.44 <a href="mailto:Moritz.KLEMM@ec.europa.eu">Moritz.KLEMM@ec.europa.eu</a></p>	<p><b>Dr. Yeun-Kyung Shin,</b> División fiebre aftosa, Agencia de Inspección Veterinaria y Fitosanitaria y Cuarentena, Joongangro 175, Manangu, Anyang, Gyeonggi-do, COREA (Rep.) 430-855 Tel: (82-31) 463.4578 Fax: (82-31) 463.4516 <a href="mailto:shinyk2009@korea.kr">shinyk2009@korea.kr</a></p>
<p><b>Dr. Mehdi El Harrak</b> Jefe del departamento de Virología, BP 4569, Avenue Hassan II, km2, Rabat-Akkari MARRUECOS Tel.: (212-37) 69.04.54 Fax: (212-37) 69.36.32 <a href="mailto:elharrak_m@hotmail.com">elharrak_m@hotmail.com</a></p>		

**SEDE DE LA OIE**

<p><b>Dr. Bernard Vallat</b> Director General OIE 12 rue de Prony 75017 París, FRANCIA Tel.: (33-1) 44.15.18.88 Fax: (33-1) 42.67.09.87 <a href="mailto:oie@oie.int">oie@oie.int</a></p>	<p><b>Dr. Kazuaki Miyagishima</b> Director general adjunto Jefe del departamento Científico y Técnico <a href="mailto:k.miyagishima@oie.int">k.miyagishima@oie.int</a></p>	<p><b>Dra. Elisabeth Erlacher-Vindel</b> Jefa adjunta del departamento Científico y Técnico <a href="mailto:e.erlacher-vindel@oie.int">e.erlacher-vindel@oie.int</a></p>
<p><b>D.ª Sara Linnane</b> Redactora científica, departamento Científico y Técnico <a href="mailto:s.linnane@oie.int">s.linnane@oie.int</a></p>	<p><b>Dr. François Diaz</b> Comisionado, departamento Científico y Técnico <a href="mailto:f.diaz@oie.int">f.diaz@oie.int</a></p>	



**PANEL DE EXPERTOS DE LA OIE EN VIGILANCIA  
DE LA COMPOSICIÓN DE LAS VACUNAS CONTRA LA GRIPE EQUINA**

**París (Sede de la OIE), 4 de marzo de 2013**

---

**Conclusiones y Recomendaciones**

**Actividad gripal en 2012**

En el transcurso de 2012, Alemania, Argentina, Chile, Estados Unidos (EEUU), Francia, Irlanda, y el Reino Unido notificaron brotes y/o casos esporádicos de gripe equina.

**Orígenes de los virus tipificados durante el año 2012**

Se aislaron y/o tipificaron virus de la gripe equina A (H3N8) de brotes en Alemania, Argentina, Chile, EE.UU., Francia, Irlanda, Reino Unido y Uruguay. Se aislaron y/o tipificaron virus de la gripe equina, en estaciones de cuarentena, de caballos recién importados de Uruguay a Dubai, y de Bélgica a Japón.

**Datos de campo**

Se confirmaron las infecciones por el virus de la gripe equina en caballos tanto vacunados como sin vacunar. Se observaron interrupciones de la vacunación en centros de entrenamiento de purasangres añeros en Kentucky, caballos de deporte en Francia y caballos de carreras en Irlanda, así como de los caballos importados en Dubai y Japón. Más de 150 animales completamente vacunados fueron afectados por tres brotes vinculados, en la región francesa de Calvados.

Los virus identificados pertenecían a los clados 1 y 2 del sublinaje Florida. Se vieron afectados caballos vacunados con distintas vacunas, incluyendo las actualizadas de acuerdo con las recomendaciones de 2004 que incorporan un virus similar a A/eq/South Africa/04/2003. Estas vacunas no se han actualizado de conformidad con las recomendaciones de 2010 y 2011, para incluir un virus del clado 2 para una protección óptima.

Se registraron víctimas mortales por infección de virus A de gripe en Francia y Uruguay.

**Tipificación de virus aislados en 2012**

Se tipificaron genéticamente los virus aislados/identificados en 2012 en brotes/focos en Alemania, Argentina, Chile, Dubai, EEUU, Francia, Irlanda, Japón, Reino Unido y Uruguay secuenciando el gen de la hemaglutinina 1 (HA1). Los virus aislados en Alemania, Argentina, Dubai, EEUU, Irlanda y Reino Unido también fueron tipificados antigénicamente por inhibición de la hemaglutinación (IH) utilizando antisueros de hurón post-infección.

**Características genéticas**

Todas las secuencias HA1 obtenidas de los virus eran del linaje americano (sublinaje Florida). Los virus identificados en Argentina, Chile y EEUU se caracterizaron como virus del clado 2. Los virus identificados en EE.UU. eran del clado 1, como también un virus asociado con un brote en Alemania. Todos los demás virus identificados en Francia, Alemania, Irlanda y Reino Unido eran del clado 2. El virus detectado en un caballo belga, en una instalación de cuarentena japonesa, era de clado 2. Los virus A de gripe, aislados en la instalación de cuarentena en Dubai, de caballos provenientes de Uruguay, eran de clado 1.

Se observaron nuevas substituciones de aminoácidos de HA en virus de ambos clados, en comparación con los aislados de 2011.

**Características antigénicas**

Los datos de HI y el análisis de la cartografía antigénica de los datos de HI disponibles para los virus aislados en 2012 indican que los dos clados del sublinaje de Florida siguen circulando juntos y evolucionando, pero actualmente están estrechamente relacionados, antigénicamente, con las cepas de la vacuna recomendada para dicho linaje.

**Conclusiones**

En 2012 no se aislaron virus eurasiáticos. Los virus aislados y tipificados eran de los clados 1 y 2 del sublinaje Florida. Queda patente la falta de eficacia de las vacunas, en particular contra los virus de los clados 1 y 2. La detección de virus de clado 1 y clado 2 en instalaciones de cuarentena en Dubai y Japón ilustra el riesgo de propagación internacional de la gripe mediante caballos vacunados e infectados, así como la necesidad de una protección óptima y de que las vacunas sean actualizadas con cepas de ambos clados.

#### **Nivel de vigilancia y actualización de las vacunas**

El panel sigue destacando la importancia de aumentar la vigilancia y la investigación sobre la ineficacia vacunal en diferentes países. El rápido envío de los virus a los Laboratorios de Referencia es esencial para que se pueda realizar un seguimiento eficaz de la deriva antigénica y genética a nivel mundial.

Las vacunas deberán incluir virus pertinentes desde el punto de vista epidemiológico.

Es necesario actualizar las vacunas en el momento adecuado para obtener una protección óptima.

#### **Recomendaciones**

No es necesario incluir un virus H7N7 ni un virus H3N8 de linaje euroasiático en las vacunas, puesto que no se han detectado durante los últimos procedimientos de vigilancia y que, por lo tanto, se supone que no están circulando.

Las vacunas para el mercado internacional deberán contener virus tanto del clado 1 como del clado 2 del sublinaje Florida:

- el clado 1 está representado por virus del tipo A/eq/South Africa/04/2003 o A/eq/Ohio/2003;
- el clado 2 está representado por virus del tipo A/eq/Richmond/1/2007.

Un panel de virus que abarca ambos clados está disponible en los Laboratorios de Referencia de la OIE.

Se alienta a los fabricantes de vacunas destinadas a un mercado estrictamente nacional a consultar los Laboratorios de Referencia, con el fin de verificar la utilización de los reactivos de referencia en el momento de proceder a la selección de cepas locales inmunógenas de reacción cruzada para los virus de la gripe equina en circulación a nivel nacional.

#### **Reactivos de referencia**

La Dirección Europea de Calidad de los Medicamentos y la Asistencia Sanitaria (EDQM) facilita los antisueros equinos post-infección liofilizados por congelación contra A/eq/Newmarket/1/93 (linaje americano H3N8) y A/eq/South Africa/4/2003 (clado 1 de Florida, sublinaje de linaje americano). A estos sueros se les asignaron valores del ensayo de hemólisis radial simple (SRH), a partir de un estudio colectivo internacional y pueden utilizarse como sueros de referencia principales para el análisis.

Cepas virales recientes y pequeñas cantidades de suero de hurón para la tipificación antigénica están disponibles en los laboratorios de referencia de la OIE.

**PANEL DE EXPERTOS DE LA OIE EN VIGILANCIA  
DE LA COMPOSICIÓN DE LAS VACUNAS CONTRA LA GRIPE EQUINA**

**París (Sede de la OIE), 4 de marzo de 2013**

---

**Lista de participantes**

**Representantes los Laboratorios de referencias de la OIE**

**Prof. Ann Cullinane**

Head of the Virology Unit  
Irish Equine Centre  
Johnstown, Naas  
Co. Kildare  
IRLANDA  
Tel.: +353-45 86.62.66  
Fax: +353-45 86. 62.73  
acullinane@equine-centre.ie

**Dr Thomas M. Chambers**

Maxwell H. Gluck Equine Research Center  
Department of Veterinary Science  
University of Kentucky  
108 Gluck Equine Research Center  
Lexington, Kentucky 40546-0099  
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA  
Tel.: +1-859 257 47 57  
Fax: +1-859 257 85 42  
tmcham1@uky.edu

**Prof. Klaus Osterrieder** (instead of Kerstin Borchers)

Institute of Virology  
Veterinary Medicine  
Free University of Berlin  
Philippstrasse 13  
10115 Berlin  
ALEMANIA  
Tel.: +49-30 20.93.65.63

**Dr Debra Elton**

Animal Health Trust  
Centre for Preventive Medicine  
Lanwades Park, Kentford  
Suffolk CB8 7UU  
REINO UNIDO  
Tel: +44-1638 75.10.00  
Fax: +44-1638 55.56.59  
debra.elton@aht.org.uk

**Representantes los Laboratorios de la OMS**

**Dr Othmar Engelhardt**

National Institute for Biological Standards and Control,  
Blanche Lane, South Mimms,  
Potters Bar, Hertfordshire  
REINO UNIDO

**Dr John McCauley**

WHO-Collaborating Centre, Virology Division  
MRC-NIMR  
London  
REINO UNIDO

**Professor Derek Smith**

WHO Collaborating Centre for Modelling, Evolution, and  
Control of Emerging Diseases  
University of Cambridge  
REINO UNIDO

**Dr Nicola Lewis**

WHO Collaborating Centre for Modelling, Evolution, and  
Control of Emerging Diseases  
University of Cambridge  
REINO UNIDO

**Otros huéspedes**

**Professor Xiaojun Wang**

Harbin Veterinary Research Institute, CAAS  
427 Maduan Street,  
Harbin, 150001  
REPÚBLICA POPULAR DE CHINA

**Dr Takashi Yamanaka**

Epizootic Research Center  
Equine Research Institute  
Japan Racing Association  
1400-4 Shiba, Shimotsuke  
Tochigi, 329-0412  
JAPÓN

**Dr María Barranteguy**

Responsable del Laboratorio de Virus Equinos  
Instituto de Virología  
CICVyA INTA  
ARGENTINA

**Dr Louise Treiberg Berndtsson**

Statens Veterinärmedicinska Anstalt  
751 89 Uppsala  
SUECIA

**Dr Adam Rash BSc**

Animal Health Trust  
Centre for Preventive Medicine  
Lanwades Park, Kentford  
Suffolk CB8 7UU  
REINO UNIDO



## Programa de trabajo de la CNB: febrero a septiembre de 2013

Tema / cuestión	Responsable(s)	Plazo
<i>Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres</i>		
Distribuir los capítulos aprobados por el Grupo de la Mesa Ampliada y la Comisión como versiones finales que serán aprobadas en mayo de 2013	SL	Mediados a finales de marzo de 2013
Recordatorio a los autores de los capítulos identificados por el Grupo de la Mesa Ampliada y la Comisión para ser aprobados en 2013 y 2014 que todavía no han sido recibidos	SL	En curso
Encargar los capítulos identificados por el Grupo de la Mesa Ampliada y la Comisión cuya aprobación será propuesta en 2014	SL	En curso
Actualización de los capítulos de enfermedades del <i>Manual</i> con arreglo al nuevo esquema	CNB/DCT	Proseguir la aplicación con la intención de finalizar todas las modificaciones para la versión impresa del <i>Manual</i> de 2016
<i>Grupos ad hoc</i>		
Bioseguridad y bioprotección en laboratorios veterinarios (cuarta reunión)	DCT: FD Miembro de la CNB que asistirá: VC, BS, PD	Fecha: julio de 2013
Secuenciación de alto rendimiento, bioinformática y genómica computacional (HTS-BCG)	DCT: EEV, FD, SL Miembro de la CNB que asistirá: VC, PD	Fecha:
Acortar el proceso de registro de vacunas cuando se trate simplemente de actualizar e incorporar las cepas pertinentes en las vacunas contra la gripe equina	DCT: SM Miembro de la CNB que asistirá: VC	Fecha:
Vacunas, actualizar capítulo 1.1.6 Principios de producción de vacunas veterinarias, y redactar dos capítulos: 1.1.8 Requisitos mínimos para las instalaciones de producción de vacunas, 1.1.9 Control de calidad de las vacunas	DCT: SM, FD	<b>Pendiente:</b> el Centro Colaborador para los productos médicos veterinarios se ofreció a hacerlo. La Comisión les pidió que colaboren con otros centros de la OIE que trabajen sobre vacunas, para producir documentos consensuados. Cuando hayan sido recibidos, se determinará si se pueden enviar directamente a los Países Miembros para que los comenten o si serán empleados como base para el trabajo de un grupo ad hoc.

<i>Reuniones</i>		
Seminario de un día que organizar con ocasión de la conferencia WAVLD en Berlín, en junio de 2013. Tema: validación o nuevos enfoques en materia de diagnóstico: genómica aplicada. Ultimar programa y ponentes	DCT y CNB	Cancelada

---



---

© **Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2013**

El presente documento fue preparado por especialistas a solicitud de la OIE. Excepto en el caso de su adopción por la Asamblea mundial de los Delegados 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.

Todas las publicaciones de la OIE (Organización mundial de sanidad animal) están protegidas por un Copyright internacional. Extractos pueden copiarse, reproducirse, adaptarse o publicarse en publicaciones periódicas, documentos, libros o medios electrónicos, y en cualquier otro medio destinado al público, con intención informativa, didáctica o comercial, siempre y cuando se obtenga previamente una autorización escrita por parte de la OIE.

Las designaciones y nombres utilizados y la presentación de los datos que figuran en esta publicación no constituyen de ningún modo el reflejo de cualquier opinión por parte de la OIE sobre el estatuto legal de los países, territorios, ciudades o zonas ni de sus autoridades, fronteras o limitaciones territoriales.

La responsabilidad de las opiniones profesadas en los artículos firmados incumbe exclusivamente a sus autores. La mención de empresas particulares o de productos manufacturados, sean o no patentados, no implica de ningún modo que éstos se beneficien del apoyo o de la recomendación de la OIE, en comparación con otros similares que no hayan sido mencionados.