

ENFERMEDAD HEMORRÁGICA EPIZOÓTICA (INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA EPIZOÓTICA)

RESUMEN

*La enfermedad hemorrágica epizootica (EHE) es una enfermedad vírica infecciosa no contagiosa transmitida por vectores que afecta a rumiantes domésticos y salvajes, principalmente al ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y al ganado bovino. Las ovejas y las cabras también podrían ser susceptibles, pero normalmente no desarrollan una enfermedad manifiesta.*

*El virus de la EHE (VEHE) se transmite entre hospedadores rumiantes por pequeños mosquitos picadores de la especie *Culicoides*, motivo por el cual las infecciones son fuertemente estacionales. El ciervo de cola blanca es la especie más gravemente afectada, en que la forma hiperaguda tiene una tasa de mortalidad alta. En el ganado bovino, casi nunca se observan signos clínicos, pero se ha documentado fiebre, anorexia, disfagia, emaciación, estomatitis ulcerosa, cojera, dificultad respiratoria y eritema de la ubre.*

Identificación del agente: *El VEHE pertenece a la familia Reoviridae, género Orbivirus, y tiene muchas características morfológicas y estructurales en común con los otros miembros del género, especialmente con el virus de la lengua azul (VLA).*

Las partículas del VEHE carecen de envoltura, pero sí tienen una cápsida doble con simetría icosaédrica. Dentro del centro se encuentran 10 segmentos genómicos de ARN bicatenarios que codifican siete proteínas estructurales (VP) y tres o cuatro proteínas no estructurales. La proteína VP2 de la parte externa del centro es el principal determinante de especificidad de serotipo, mientras que la VP7 de la parte interna del centro posee los antígenos específicos de serogrupo. Se han identificado al menos siete serotipos claramente distintos, pero existe cierta incertidumbre respecto al número exacto de serotipos, y todavía no existe un grupo de cepas de referencia del VEHE oficialmente reconocido.

Las pruebas para identificar el VEHE en muestras de campo son el aislamiento vírico en cultivo celular, pruebas de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) específicas de serogrupo de la EHE, y enzoinmunoanálisis (ELISA) de competición (captura de antígeno) y en sándwich. Se han desarrollado RT-PCR específicas de serotipo para identificar el serotipo de cepas aisladas en cultivo celular. También pueden identificarse cepas mediante secuenciación de alto rendimiento o pruebas de neutralización vírica.

Pruebas serológicas: *Los anticuerpos contra el VEHE en general empiezan a ser detectables a los 10-14 días de la exposición. Los anticuerpos neutralizantes y el virus pueden coexistir en el animal infectado, probablemente por la fuerte asociación entre el VEHE y los eritrocitos.*

Para la detección de anticuerpos anti-VEHE en los sueros de animales expuestos, se recomienda un ELISA de competición (C-ELISA) basado en anticuerpos monoclonales específicos. El C-ELISA es una prueba rápida, que detecta anticuerpos contra la proteína VP7. También pueden llevarse a cabo pruebas de neutralización del virus (VN). Las pruebas de VN suelen realizarse para detectar exposición a serotipos específicos del VEHE; sin embargo, la VN es más lenta (3-5 días) y laboriosa, y las reacciones cruzadas entre serotipos podrían afectar a los resultados. También pueden usarse pruebas como la inmunodifusión en gel de agar y el ELISA indirecto, pero tienen el gran inconveniente de que no sirven para distinguir entre anticuerpos contra el VEHE y contra el VLA.

Requisitos para las vacunas: En EE.UU., se ha administrado una vacuna autógena que solo se puede utilizar en ciervos salvajes que vivan en cautividad, y en Japón se ha desarrollado una vacuna para el ganado bovino. Además de estos dos contextos tan limitados, ha habido poco interés por parte de los laboratorios y de otras industrias relacionadas con la preparación de vacunas en los países en vías de desarrollo para controlar la enfermedad o la circulación del VEHE.

A. INTRODUCCIÓN

La enfermedad hemorrágica epizootica (EHE) es una enfermedad vírica infecciosa no contagiosa que se transmite por insectos del género *Culicoides*. Los datos de que se dispone establecen que las especies de *Culicoides* que transmiten el virus de la EHE (VEHE) probablemente sean similares, aunque no necesariamente las mismas, que las que transmiten el virus de la lengua azul (VLA) (Carpenter *et al.*, 2008). La enfermedad afecta a rumiantes tanto salvajes como domésticos, en particular a cérvidos de Norteamérica y, en menor medida, al ganado bovino (Bréard *et al.*, 2004), aunque muchos países describen solo una infección asintomática (Gard & Melville, 1992; St George *et al.*, 1983).

En las especies susceptibles, el VEHE puede causar una enfermedad con signos clínicos similares a los de la infección por el VLA. El ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) es la especie más gravemente afectada por la forma hiperaguda, que cursa con fiebre, anorexia, dificultad respiratoria y edema intenso en la cabeza y el cuello. También puede haber hinchazón de la lengua y de las conjuntivas. En la forma aguda (o clásica), estos signos clínicos pueden cursar con hemorragias en muchos tejidos, como la piel y el corazón, y los animales pueden presentar úlceras o erosiones en la lengua, la almohadilla dental, el paladar, el rumen y el abomaso (Savini *et al.*, 2011).

Las lesiones histopatológicas son vasculitis diseminada con trombosis, hinchazón endotelial, hemorragias y necrosis en muchos órganos, especialmente la lengua, las glándulas salivares, los pre-estómagos, la aorta y el músculo papilar del ventrículo izquierdo del miocardio. También se han descrito placas grises dispersas en la superficie de la mucosa de la vejiga urinaria (Noon *et al.*, 2002).

En el ganado bovino, la enfermedad se caracteriza por cursar con fiebre, anorexia, estomatitis ulcerosa, hinchazón palpebral, dificultad respiratoria, secreción nasal y ocular, enrojecimiento y descamación del hocico y los labios, cojera, eritema en las ubres y dificultad para deglutir (Temizel *et al.*, 2009). La enfermedad de Ibaraki del ganado bovino está causada por una cepa del VEHE de tipo 2 (Anthony *et al.*, 2009). Los animales se deshidratan y quedan caquéuticos, y en algunos casos mueren debido a una neumonía por aspiración. Histológicamente, las lesiones se caracterizan por una degeneración hialina, necrosis y mineralización del músculo estriado, acompañadas de una infiltración de neutrófilos, linfocitos e histiocitos (Ohashi *et al.*, 1999; Savini *et al.*, 2011).

Por lo que se sabe, el VEHE no causa enfermedad en el ser humano en ningún caso.

Taxonómicamente, el VEHE se clasifica en el género *Orbivirus* de la familia Reoviridae (McLachlan & Osburn, 2004). Es un virus de ARN bicatenario con un genoma de 10 segmentos. Actualmente, se reconocen siete serotipos, pero el número exacto de serotipos todavía no está del todo claro (Anthony *et al.*, 2010). El virus es estable a -70°C y en la sangre, en una suspensión de tejidos o en de células hemáticas lavadas y mantenidas a 4°C. En las superficies de un laboratorio, el VEHE es susceptible al etanol al 95% y a una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%.

Las partículas del VEHE están formadas por tres capas de proteína. La cápsida externa consiste en dos proteínas, VP2 y VP5. Como ocurre con el VLA, la VP2 es el determinante principal de la especificidad de serotipo. La VP5, la otra proteína externa, también podría estimular la producción de anticuerpos neutralizantes (Savini *et al.*, 2011; Schwartz-Cornill *et al.*, 2008). Esta cápsida externa se disocia fácilmente del núcleo, dejando un núcleo icosaédrico bicapa formado por dos proteínas principales, la VP7 y la VP3, que envuelven el complejo de la transcriptasa (VP1, VP4 y VP6) y los segmentos de ARN genómicos. La VP7 es la proteína inmunodominante específica de serogrupo, y la que se utiliza en los ensayos de inmunoenzimología (ELISA) específicos de serogrupo (Saif, 2011). El ARN vírico también codifica tres o cuatro proteínas no estructurales (Belhouchet *et al.*, 2011).

Dado que es una enfermedad vírica transmitida por vectores, la distribución de la EHE se limita a la de los vectores *Culicoides* competentes (Mellor *et al.*, 2008). El VEHE se ha aislado de rumiantes salvajes y domésticos y de artrópodos en Norteamérica, Asia, África y Australia, y más recientemente en países de la cuenca del Mediterráneo, como Marruecos, Alger, Túnez, Israel, Jordania y Turquía. En Europa no se han notificado casos de infección por el VEHE. Los brotes en general coinciden con el pico de abundancia en la población del vector,

de tal modo que la mayoría de casos de EHE tienen lugar a finales de verano y en otoño (Mellor *et al.*, 2008; Stallknecht & Howerth, 2004).

Dado que el VEHE se transmite por vectores, puede ser difícil controlarlo o erradicarlo una vez establecido. Ciertas variables imprevistas e incontrolables, como factores climáticos y geográficos, así como la abundancia de insectos vectores del VEHE son importantes para las consecuencias y la persistencia (re-aparición) del VEHE en una zona. Además, hasta ahora no ha habido estudios sobre el efecto de las medidas de control que se aplican en los países en que la enfermedad ha afectado al ganado bovino. Los sueros preparados a partir de animales virémicos pueden suponer cierto riesgo si se administran por vía parenteral a animales previamente no expuestos. La amenaza más importante del VEHE tiene lugar cuando el virus se inocula por vía parenteral a animales susceptibles. Si existe el mosquito *Culicoides* adecuado, el virus se puede transmitir a otros hospedadores. Por lo tanto, debe controlarse el periodo de viremia de los animales infectados por el VEHE deben, y deben protegerse físicamente contra *Culicoides*.

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

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

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

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

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito. Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido validadas formalmente, su uso sistemático y hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hace aceptables.

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; C-ELISA = enzimoimmunoanálisis; VN = neutralización vírica; AGID = inmunodifusión en gel de agar; CF = fijación del complemento.

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

Los signos clínicos de la EHE en rumiantes salvajes y en el ganado bovino son similares a los de la lengua azul (LA) en ovejas y ganado bovino, y pueden ser similares a los que se observan en otras enfermedades del ganado bovino, como la diarrea viral bovina/enfermedad de las mucosas, la rinotraqueítis infecciosa bovina, la estomatitis vesicular, la fiebre catarral maligna y la fiebre efímera bovina. El diagnóstico definitivo de la infección por el VEHE requiere el uso de pruebas de laboratorio específicas.

1. Identificación del agente causante de la EHE

1.1. Cultivo *in vitro*

1.1.1. Aislamiento en cultivo celular

Se utilizan los mismos procedimientos diagnósticos tanto para rumiantes domésticos como para salvajes. El aislamiento del virus se puede intentar a partir de la sangre de animales virémicos o muestras de tejidos, como el bazo, el pulmón o ganglios linfáticos de canales infectadas, y de *Culicoides* sp. El VEHE se puede aislar mediante inoculación de cultivos celulares, como los formados por células de endotelio de arteria pulmonar bovina, de riñón de hámster neonato (BHK-21) y de riñón de mono verde africano (Vero) (Aradaib *et al.*, 1994), siendo los dos últimos los más utilizados para cultivar el virus. Para el aislamiento del virus también pueden utilizarse células de *Aedes albopictus* (por ejemplo, C6/36) o de *Culicoides variipennis* (Kc) (Batten *et al.*, 2011; Eschembauer *et al.*, 2012; Gard *et al.*, 1989), así como huevos de gallina embrionados, aunque estos ofrecen menor sensibilidad (Eschembauer *et al.*, 2012). El efecto citopático (ECP), que solo tiene lugar en líneas celulares de mamífero, normalmente aparece entre el 2° y 7° día post-inoculación, aunque puede ser necesario un pase ciego.

A continuación se detalla un procedimiento general de aislamiento del virus en cultivo celular, que puede modificarse según las necesidades de cada laboratorio. La incubación de los cultivos celulares para el aislamiento del VEHE suele realizarse en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂.

- i) Cuando se trata de tejidos de casos clínicos, se prepara una suspensión de tejido al 10–30% en cultivo celular u otro medio apropiado que contenga antibióticos. Se centrifuga y se guarda el sobrenadante para el aislamiento del virus.
- ii) Cuando se trata de sangre total no coagulada, la sangre se centrifuga para separar los eritrocitos del plasma. Se desecha el plasma y se sustituye por solución salina tamponada con fosfato (PBS). La sangre se centrifuga de nuevo para separar los eritrocitos. Se llevan a cabo tres lavados totales con PBS. Se añaden 0,2 ml de eritrocitos a 4,0 ml de agua destilada estéril para lisar los eritrocitos. Como alternativa, las células se pueden lisar por sonicación. Se añaden 6,0 ml de caldo de peptona-lactosa tamponada a la muestra. Se centrifuga y se guarda el sobrenadante para el aislamiento del virus.
- iii) Se desecha el medio del recipiente que contiene la monocapa de células nuevas (de 1–3 días).
- iv) Se inocula a las células una parte de la suspensión clarificada de tejido o eritrocitos, o de cultivo celular del pase previo.
- v) Se incuba a 34–37°C durante 1 hora. Para permitir la transferencia de gases, deben aflojarse los tapones de los frascos e cultivo celular, o bien utilizar tapones perforados.
- vi) Se desecha el inóculo y se lava la monocapa con un medio que contenga antibióticos, una vez o dos. Se añade medio de mantenimiento y se devuelve a la incubadora.
- vii) Se comprueba regularmente si las células presentan ECP. Solo se observa ECP en líneas celulares de mamífero y normalmente aparece a los 2 a 7 días post-inoculación.
- viii) Si no aparece ECP, debe intentarse un segundo y un tercer pase. Se raspan las células con un raspador o se congelan y descongelan una vez y se inoculan cultivos frescos.
- ix) Si hay ECP, que indica la presencia del virus, la identidad de la cepa aislada se puede confirmar mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), ELISA de captura de antígeno, inmunofluorescencia o neutralización vírica.

1.1.2. Identificación de las cepas aisladas a nivel de serogrupo

- i) *Métodos moleculares*

En el Apartado 1.2.1 se describen los métodos de la PCR.

ii) *Métodos inmunológicos*

Los serogrupos de las cepas de Orbivirus suelen establecerse en función de su reactividad con antisueros patrón específicos que detectan proteínas que se conservan dentro de cada serogrupo, como la VP7. La reactividad cruzada entre miembros de serogrupos de la EHE y la LA comporta que una cepa del VLA pueda confundirse con el VEHE si se obtiene una reacción de inmunofluorescencia débil con un antisuero policlonal anti-VEHE. Por este motivo, puede utilizarse un anticuerpo monoclonal (MAb) contra el VEHE específico de serogrupo. Varios laboratorios han generado este tipo de reactivos específicos de serogrupo (Luo & Sabara, 2005; Mecham & Jochim, 2000; Mecham & Wilson, 2004; White *et al.*, 1991). Los métodos de uso frecuente para la identificación de virus hasta el nivel de serogrupo se indican a continuación.

a) Inmunofluorescencia

Se infectan monocapas de células BHK-21 o Vero en portas de cámara (cubreobjetos de vidrio) con virus adaptado al cultivo tisular o bien virus de lisados celulares de insecto. Tras 24-48 horas a 37°C, o tras la aparición de un ECP leve, las células infectadas se fijan con agentes como el paraformaldehído, la acetona o el metanol, se secan y se detecta el antígeno vírico con antisuero anti-VEHE o MAb específicos del VEHE y procedimientos estándar de inmunofluorescencia.

b) ELISA sándwich específico de serogrupo

El ELISA sándwich específico de serogrupo permite detectar el VEHE en insectos infectados y en preparaciones de cultivo tisular (Thevasagayam *et al.*, 1996). Es una prueba específica del VEHE, sin reacciones cruzadas con otros orbivirus, como el VLA o el virus de la peste equina africana (VPEA).

1.1.3. Identificación de las cepas aisladas a nivel de serotipo

i) *Métodos moleculares*

a) Reacción en cadena de la polimerasa

La reciente identificación del genoma de las cepas aisladas de VEHE ha permitido la identificación molecular a nivel de serotipo y/o topotipo mediante RT-PCR empleando cebadores específicos de serotipo y a continuación una secuenciación (Maan *et al.*, 2010).

b) Secuenciación de alto rendimiento

La secuenciación de alto rendimiento se puede llevar a cabo en cepas con o sin cebadores específicos de serotipo. Las secuencias se pueden comparar con la base de datos GenBank para identificarlas a nivel de serotipo.

ii) *Técnicas inmunológicas*

a) Serotipificación mediante neutralización vírica

Existe gran variedad de métodos basados en el cultivo tisular para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el VEHE. Las líneas celulares que se suelen utilizar son BHK-21 y Vero. A continuación, se describen brevemente dos métodos de serotipificación del VEHE. Se ha observado que los antisueros contra el VEHE específicos de serotipo generados en cobayas o conejos presentan menor reactividad cruzada a nivel de serotipo que los que se generan en ganado bovino u ovejas. Es importante que se incluyan antisueros control.

• Reducción de placas

El virus que vaya a serotipificarse deberá someterse a una dilución seriada e incubarse, o bien sin antisuero o bien con una dilución constante de antisueros patrón individuales contra un grupo de serotipos del VEHE. Se añaden mezclas de virus/antisuero a las monocapas de células. Tras la adsorción durante 1 hora a 37°C y con un 5% de CO₂, y tras eliminar el inóculo, las monocapas se cubren con un medio de cultivo celular que contenga un 0,8-0,9% de agarosa. Las placas/frascos se incuban a 37°C y con un 5% de CO₂. Tras una incubación de 4 días, se aplica un segundo recubrimiento que contenga 0,01% (1 parte por 10.000) de rojo neutro y un 0,8-0,9% de agarosa en el medio de cultivo celular, y las placas/frascos se incuban a 37°C y con un 5% de CO₂. Se comprueba a

diario si los frascos presentan placas visibles, durante un máximo de 3 días. Los títulos de anticuerpos neutralizantes se determinan como el recíproco de la dilución sérica que causa una reducción establecida (por ejemplo, del 90%) en el número de unidades formadoras de placas. El virus no identificado se considera serológicamente idéntico a un serotipo estándar si en la prueba este último se analiza simultáneamente al virus no tipificado, y se neutraliza de forma similar.

- Neutralización en placas de microtitulación

Se añaden unas 100 DICT₅₀ (dos infectivas en un 50% de los cultivos celulares expuestos) del patrón o de una dilución seriada del virus no tipificado, en volúmenes de 50 µl, a los pocillos problema de una placa de microtitulación de fondo plano, y se mezclan con un volumen igual de una dilución constante de antisuero patrón en medio de cultivo tisular. Tras una incubación de 1 hora a 37°C y con un 5% de CO₂, se añaden unas 10⁴ células por pocillo en un volumen de 100 µl, y las placas se incuban durante 3-5 días a 37°C y con un 5% de CO₂. La prueba se lee con un microscopio invertido. Los pocillos se puntúan según el grado de ECP observado. Los que contienen solo células o células y antisuero, no deben presentar ECP. Por el contrario, los que contienen células y virus deben presentar un 75-100% de ECP. El virus no identificado se considera que es serológicamente idéntico a un serotipo estándar del VEHE si en la prueba ambos se neutralizan hasta un nivel similar, es decir, si se observa una protección de la monocapa del 75%, aunque preferiblemente del 100%.

1.2. Métodos moleculares – detección de ácido nucleico

1.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

En los últimos años se han invertido varios recursos en el desarrollo de técnicas moleculares innovadoras, como la RT-PCR para la detección rápida de ácido nucleico del VEHE (Aradaib *et al.* 2003; Clavijo *et al.*, 2010; Wilson, 1994; Wilson *et al.*, 2009). La RT-PCR permite detectar ARN del VEHE en muestras de sangre y de otros tejidos. Además, se han desarrollado RT-PCR específicas de serotipo que tienen por diana el segmento 2 del ARN vírico (Brodie *et al.*, 1998; Maan *et al.*, 2010), así como RT-PCR múltiple en tiempo real para discriminar entre el VEHE y el VLA (Wilson *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2010). Aunque la RT-PCR tiene una sensibilidad y especificidad alta, el diagnóstico basado en esta técnica debe interpretarse con cautela: la RT-PCR detecta ARN vírico a un nivel de sensibilidad muy alto, pero dicha detección no necesariamente indica la presencia del virus infeccioso. Con RT-PCR y muestras de sangre, no se sabe durante cuánto tiempo se siguen obteniendo resultados positivos para el VEHE, pero existen indicios de que se siguen obteniendo incluso después de que ya no pueda aislarse el virus infeccioso, como se ha observado en el caso del VLA.

La capacidad de las pruebas de RT-PCR de detectar cantidades muy pequeñas de moléculas de ácido nucleico indica que estas pruebas son exquisitamente sensibles a la contaminación por ácidos nucleicos extraños, como por ejemplo, cualquier cebador que se utilice en el laboratorio o polinucleótidos amplificados con anterioridad. Por lo tanto, es fundamental disponer de una zona “limpia” que contenga todo el equipo necesario para la preparación de reactivos y de la prueba, y de una zona independiente con su propio equipo de amplificación. Asimismo, es necesario emplear guantes impermeables y cambiarlos a menudo en todas las etapas del procedimiento, sobre todo después de trabajar con el ARN o el ADN amplificado de la muestra. Ello contribuirá a proteger los reactivos y las muestras de la contaminación por RNAsas ubicuas y otros reactivos, así como de la contaminación cruzada por ADN.

i) *Extracción de ARN de muestras de sangre, insectos o tejido*

Existe una gran variedad de kits comerciales: el paso de extracción de ARN debe adaptarse a la muestra que se está analizando (por ejemplo, diferirá en función de si se trata de sangre o de tejido), y puede realizarse siguiendo las indicaciones de los fabricantes.

ii) *Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa*

Actualmente existen en el mercado varios kits de RT-PCR de un solo paso. Como alternativa, puede llevarse a cabo un procedimiento de dos pasos, que consiste en un paso inicial de RT seguido de una amplificación de ADNc. La mayoría de estos métodos siguen requiriendo un protocolo adecuado de validación. Las recomendaciones generales podrían tener que modificarse según las necesidades específicas de la zona o del caso,

como se indica a continuación. El método descrito por Aradaib *et al.* (2003), dirigido al gen S6 del VEHE, se ha tomado como ejemplo de RT-PCR convencional.

Secuencias de los cebadores:

Directo: 5'-TCG-AAG-AGG-TGA-TGA-ATC-GC-3';

Inverso: 5'-TCA-TCT-ACT-GCA-TCT-GGC-TG-3'.

- a) Se diluyen soluciones primarias de cebador hasta una concentración final de 10 pmol/μl.
- b) Se etiquetan tubos de RT-PCR de un solo paso y se añaden 4,0 μl de mezcla de cebador a cada tubo. Los tubos se mantienen sobre hielo.
- c) A continuación, se añaden 4 μl de muestra de ARN problema, de control positivo y de control negativo a los 4 μl de la mezcla de cebador de los tubos de RT-PCR.
- d) Desnaturalización por calor: 95°C durante 5 minutos, y a continuación hielo durante 3 minutos más.
- e) La mezcla de RT-PCR de un solo paso se prepara, según las indicaciones del fabricante, con suficiente volumen de reactivos como para el número de muestras que se analizará.
- f) Se añade mezcla de un paso a la mezcla desnaturalizada hasta un volumen final de 50 μl.
- g) Los tubos se colocan en un termociclador programado para la transcripción inversa y la amplificación de ADNc, según indique el fabricante.

iii) *Análisis del product de la RT-PCR mediante electroforesis*

A continuación, debe visualizarse la presencia de VEHE en los productos de la RT-PCR mediante procedimientos estándar de análisis por electroforesis.

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

Se han utilizado pruebas basadas en RT-PCR para detectar ARN del VEHE en muestras clínicas. Se dirigen RT-PCR específicas de serogrupo a genes altamente conservados del VEHE, como el S6 o el S10, o genes menos conservados, como el S3. No obstante, ninguna de estas pruebas ha sido capaz de discriminar simultáneamente todos los serotipos del VEHE. Existe poca información, o nada en absoluto, acerca de la capacidad de las pruebas publicadas de detectar todos los serotipos, pero se ha observado que la RT-PCR en tiempo real que se describe más adelante (Clavijo *et al.*, 2010) reconoce y cuantifica todos los serotipos del VEHE. El gen al que va dirigido este método es el NS1.

Secuencias de los cebadores

Directo: 5'-ACW-GGV-ATC-ATG-TTT-GAG-CT-3'; Inverso: 5'-TTC-ATA-ACC-GCA-CCT-TCA-TC-3', correspondientes a las bases 1495 a 1605 del gen NS1.

Secuencias de las sondas

P1: 6FAM-TCA-TCA-CAC-ATC-GGC-MGB-NFQ; P2: 6FAM-TCT-CGG-CAT-ATG-CGA-GCM-GBN-FQ, correspondientes a las bases 1516 a 1550.

La amplificación por PCR se lleva a cabo utilizando un kit de RT-PCR de un solo paso. La mezcla contiene tampón 1x, MgSO₄ 3 mM, 40 pmol de cebador directo, 20 pmol de cebador inverso, 4,5 pmol de sonda 1, 1,5 pmol de sonda 2, 0,5 μl de mezcla Taq y 3 μl de molde en un volumen de reacción total de 25 μl. La amplificación y la detección de la fluorescencia se llevan a cabo empleando un sistema de detección de secuencia con un programa que consiste en un paso de transcripción inversa a 45°C durante 40 minutos seguido de un paso de inactivación y desnaturalización de 95°C durante 10 minutos. El ciclo de amplificación mediante PCR consiste en 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 50°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, con un paso de extensión final de 72°C durante 3 minutos.

Este método es sensible y específico, y no se observa amplificación con ninguno de los 24 serotipos del VLA relacionados. Existen kits comerciales de RT-PCR en tiempo real que se basan en el segmento 9 del genoma, y se utilizan mucho. Detectan todos los serotipos conocidos del VEHE, posiblemente apenas 2 días después de la infección (Batten *et al.*, 2012).

2. Métodos serológicos

Tras la infección por el VEHE, en general los anticuerpos se empiezan a poder detectar a los 10–14 días post-infección (Eschbaumer *et al.*, 2012; Quist *et al.*, 1997). Como ocurre con el VLA, los animales infectados por el VEHE podrían tener anticuerpos neutralizantes y viremia por la EHE al mismo tiempo; esto es posible por la fuerte relación existente entre los virus y los eritrocitos. La duración de la inmunidad adquirida todavía se desconoce, pero los datos obtenidos de infecciones naturales establecen que podría tratarse de una inmunidad de por vida. Existen varios métodos serológicos, de distintas sensibilidades y especificidades, para detectar anticuerpos contra el VEHE específicos de serogrupo y de serotipo.

2.1. Enzimoimmunoanálisis de competición (C-ELISA)

El ELISA de competición (C-ELISA) para detectar la EHE se desarrolló para medir los anticuerpos específicos contra el VEHE sin detectar anticuerpos contra otros orbivirus que pudieran generar reacción cruzada. Estas técnicas, en las que se utilizan MAb contra la proteína VP7 del VEHE permiten detectar anticuerpos contra el VEHE específicos de serogrupo (Luo & Sabara, 2005; Mecham & Jochim, 2000; Mecham & Wilson, 2004; White *et al.*, 1991), y actualmente son la técnica de elección.

2.1.1. Procedimiento analítico

Existen varios procedimientos analíticos descritos; este es un ejemplo de un C-ELISA para EHE. La técnica del C-ELISA es similar, excepto por el hecho de que en este caso la proteína VP7 recombinante expresada por *Baculovirus* es capturada por anticuerpos anti VP7 policlonales generados en conejo y previamente adsorbidos a los pocillos (Mecham & Wilson, 2004).

- i) Se recubren placas de microtitulación de 96 pocillos con 100 µl de la VP7 recombinante expresada en *Baculovirus*, a lo largo de toda la noche a 4°C (Luo & Sabara, 2005), y se diluyen en tampón carbonato 0,05 M, a pH 9,6.
- ii) Las placas se lavan tres veces con PBST (PBS 0,01 M que contenga Tween 20 al 0,05% o al 0,1%, pH 7,4) y a continuación se bloquean durante 1 hora con leche en polvo al 5% a temperatura ambiente.
- iii) Tras el lavado con PBST, se añaden 100 µl de los sueros problema por duplicado a una dilución única, de 1/5, 1/10 o 1/20 en PBST que contenga leche en polvo al 2,5%.
- iv) Inmediatamente, se añaden a cada pocillo 100 µl de una dilución predeterminada de MAb diluida en PBST. Los pocillos control con MAb contienen tampón diluyente en lugar del suero problema.
- v) Las placas se incuban durante 1 hora a 37°C y a continuación se vuelven a lavar con PBST como se ha descrito arriba.
- vi) Tras el lavado, los pocillos se llenan con 100 µl de una dilución apropiada en PBST de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano.
- vii) Tras la incubación de 1 hora a 37°C, la solución de conjugado se desecha y las placas se lavan tres veces con PBST. Los pocillos se llenan con 100 µl de solución sustrato y las placas se agitan a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- viii) La reacción se detiene por adición de un reactivo de parada apropiado, y tras hacer que el lector del ELISA lea el blanco en los pocillos que contienen sustrato y reactivo de parada, se miden los valores de absorbancia utilizando los filtros correspondientes.
- ix) Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición y derivan de los valores de absorbancia media de cada muestra, según la siguiente fórmula:
$$\% \text{ inhibición} = 100 - \left[\frac{\text{absorbancia media de la muestra problema}}{\text{absorbancia media del MAb control}} \times 100 \right]$$

NB: Algunos laboratorio prefieren utilizar un suero control negativo que previamente haya mostrado un porcentaje de inhibición de cero, como alternativa al MAb control.

- x) Los porcentajes de inhibición >50% se consideran positivos. Las inhibiciones de entre un 40% y un 50% se consideran sospechosas. Los resultados de los duplicados de sueros problema pueden variar siempre que no fuera del intervalo de positividad.

- xi) En cada placa deben incluirse sueros fuertemente positivos, débilmente positivos, y negativos. El suero débilmente positivo deben dar un 60-80% de inhibición, y el negativo debe dar menos de un 40% de inhibición.

Ahora existen C-ELISA comerciales basados en la VP-7 recombinantes y en MAb anti-VP7. Estas pruebas comerciales se utilizan a diario en muchos laboratorios de todo el mundo.

2.2. Neutralización del virus

La prueba de referencia para identificar y cuantificar en las muestras problema anticuerpos contra los serotipos del VEHE es la neutralización vírica (VN). Esta técnica detecta y cuantifica anticuerpos específicos de serotipo. El principal inconveniente es que en la prueba deben incluirse todos los serotipos víricos sospechados, y en consecuencia puede resultar muy lenta y laboriosa. La VN requiere 3-5 días en total (Pearson *et al.*, 1992).

2.2.1. Procedimiento analítico

Las líneas celulares habitualmente utilizadas son la BHK-21 y la Vero, y un título superior o igual a 1/10 se suele considerar específicos del VEHE.

Se ha observado que los antisueros contra el VEHE específicos de serotipo generados en cobayas o conejos presentan menos reactividad cruzada, respecto a otros serotipos, que los antisueros que se generan en ganado bovino o en ovejas. Es importante incluir antisueros control.

- i) Se añaden 50 µl de diluciones de sueros, de entre 1/10 y 1/1280, a cada pocillo problema de placas de microtitulación de fondo plano, y cada uno de estos volúmenes se mezcla con un volumen igual de serotipos conocidos del VEHE (100 DIC₅₀). Las placas se incuban a 37°C con un 5% de CO₂.
- ii) Tras una hora de incubación, se añaden alrededor de 10⁴ células Vero por pocillo en un volumen de 100 µl de medio mínimo esencial (MEM) que contenga antibióticos y, tras una incubación durante 4-6 días, la prueba se lee con un microscopio invertido.
- iii) Los pocillos se puntúan según el grado de ECP observado. Una muestra se considera positiva cuando presenta un 75% de inhibición del ECP, aunque preferiblemente un 100%, a la dilución más baja (1/10). El título sérico es la dilución sérica más alta capaz de reducir en más de un 75% el ECP en el cultivo celular.

2.3. Fijación del complemento

La prueba de la fijación del complemento (CF) es sensible y específica para el diagnóstico del VEHE, y se utilizó hasta 1980 para el diagnóstico y la certificación de animales para la exportación. Es una prueba específica de serogrupo y barata, con una sensibilidad similar a la neutralización del virus (VN) y a la inmunodifusión en gel de agar (AGID). La CF permite detectar y cuantificar anticuerpos durante 4–12 meses tras la infección, pero más allá de este periodo es menos fiable (Pearson *et al.*, 1992). La CF es especialmente útil para detectar infecciones recientes por el VEHE, pero no para detectar infecciones más antiguas.

2.4. Inmunodifusión en gel de agar

La AGID se utilizó mucho para detectar anticuerpos contra el VEHE en sueros de animales infectados (Dubay *et al.*, 2004). En el pasado, esta prueba se empleaba para el comercio de animales. Es sencilla y barata, y el antígeno que se emplea es relativamente fácil de generar. No obstante, el inconveniente de la AGID es la falta de especificidad para discriminar entre el VLA y el VEHE. Así pues, los sueros que daban positivo con la AGID tenían que volver a analizarse con una prueba específica de serogrupo, al menos en aquellos lugares en que pudieran estar circulando al mismo tiempo el VLA y el VEHE. Además, aunque es semi-cuantitativa, el resultado de la AGID en general se comunica como positivo o negativo. La AGID permite detectar anticuerpos desde los días 5–15 días hasta los 2 años o más tras la infección (Pearson *et al.*, 1992).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

Con ánimo de controlar la enfermedad, en EE.UU. se han desarrollado vacunas para utilizar en ciervos salvajes que vivan en cautividad, y en Japón se ha desarrollado una vacuna para el ganado bovino. Además de estos dos

contextos tan limitados, ha habido poco interés por parte de los laboratorios y de empresas de productos biológicos en la preparación de vacunas para controlar la enfermedad o la circulación del virus. En Norteamérica se han preparado vacunas autógenas inactivadas a partir de cepas del VEHE procedentes de animales enfermos o muertos en zonas afectadas. Su uso debe ser aprobado por las autoridades nacionales, y antes de su liberación, debe comprobarse la pureza y la seguridad de dichas vacunas. Para que estén disponibles oportunamente, no se comprueba la eficacia de estas vacunas autógenas. La mayoría de aplicaciones las realizan productores de ciervos, y dado que las vacunas contienen virus inactivado, en general es necesario aplicar dos dosis, con una diferencia entre ellas de 2-4 semanas, para inmunizar inicialmente a los animales, y se recomienda una revacunación anual.

En Japón, se han desarrollado vacunas para controlar la enfermedad de Ibaraki, tanto vivas modificadas como inactivadas. La vacuna viva atenuada derivada de la cepa Ibaraki-2 se utilizó tras los brotes de los años 1980, y se observó que era segura y efectiva, al menos hasta 1997 (Ohashi *et al.*, 1999). Esta vacuna debe administrarse en una sola dosis subcutánea durante la estación de escasa presencia del vector. En los programas nacionales de vigilancia y de seguimiento intensivo de crías centinela, aplicados durante muchos años, no se detectó la enfermedad de Ibaraki ni la seroconversión hasta 1997, cuando se observaron nuevos casos de la enfermedad (Ohashi *et al.*, 1999). Merece la pena destacar que el brote de 1997 se caracterizó por abortos y nacidos muertos, signos clínicos que no se habían observado en los brotes previos. La vacuna inactivada incluye los virus de la fiebre efímera bovina y de Ibaraki cultivados en cultivos celulares e inactivados mediante formalina, y está adyuvantada con un gel de aluminio. En Japón, ambas vacunas se utilizaron de forma voluntaria teniendo en cuenta la situación epidemiológica.

BIBLIOGRAFÍA

ANTHONY S.J., MAAN S., MAAN N., KGOSANA L., BACHANEK-BANKOWSKA K., BATTEN C., DARPEL K.E., SUTTON G., ATTOUI H. & MERTENS P.P.C (2009). Genetic and phylogenetic analysis of the outer-coat proteins VP2 and VP5 of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV): Comparison of genetic and serological data to characterise the EHDV serogroup. *Virus Res.*, **145**, 200–210.

ANTHONY S.J., DARPEL K.E., MAAN S., SUTTON G., ATTOUI H. & MERTENS P.P.C. (2010). The evolution of two homologues of the core protein VP6 of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV), which correspond to the geographical origin of the virus. *Virus Res.*, **145**, 211–219.

ARADAIB I.E., SAWYER M.M. & OSBURN B.I. (1994). Experimental epizootic hemorrhagic disease virus infection in calves: virologic and serologic studies. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**, 489–491.

ARADAIB I.E., MOHAMED M.E.H., ABDALLA M.A., KARRAR A.E., MAJID A.A., OMER R.A., ELAMIN S.M.M., SALIH M.M. & IDRESS S.H. (2003). Simultaneous detection and identification of epizootic hemorrhagic disease virus serotype 1 and 2 using a multiplex RT PCR. *J. Anim. Vet. Adv.*, **2**, 585–589.

BATTEN C.A., EDWARDS L., BIN-TARIF A., HENSTOCK M.R. & OURA C.A. (2011). Infection kinetics of epizootic haemorrhagic disease virus serotype 6 in Holstein-Friesian cattle. *Vet. Microbiol.*, **154**, 23–28.

BATTEN C.A., HENSTOCK M.R., BIN-TARIF A., STEEDMAN H.M., WADDINGTON S., EDWARDS L. & OURA C.A. (2012). Bluetongue virus serotype 26: infection kinetics and pathogenesis in Dorset Poll sheep. (2012). *Vet. Microbiol.*, **157**, 119–124.

BELHOUCHE M., MOHD JAAFAR F., FIRTH A.E., GRIMES J.M., MERTENS P.P. & ATTOUI H. (2011). Detection of a fourth orbivirus non-structural protein. *PLoS one*. **6**:e25697.

BREARD E., SAILLEAU C., HAMBLIN C., GRAHAM S.D., GOURREAU J.M. & ZIENTARA S. (2004). Outbreak of epizootic haemorrhagic disease on the island of La Réunion. *Vet. Rec.*, **155**, 422–423.

BRODIE S.J., BARDSLEY K.D., DIEM K., MECHAM J.O., NORELIUS S.E. & WILSON W.C. (1998). Epizootic hemorrhagic disease: analysis of tissues by amplification and *in situ* hybridization reveals widespread orbivirus infection at low copy numbers. *J. Virol.*, **72**, 3863–3871.

CARPENTER S., MELLOR P.S. & TORR S.J. (2008). Control techniques for *Culicoides* biting midges and their application in the UK and northwestern Palaearctic. *Med. Vet. Entomol.*, **22**, 175–187.

CLAVIJO A., SUN F., LESTER T., JAPERSON T.L. & WILSON W.C. (2010). An improved real time reverse transcription polymerase chain reaction for the simultaneous detection of all serotypes of epizootic hemorrhagic disease virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **22**, 588–593.

- DUBAY S.A., DEVOS J.C., NOON T.H. & BOE S. (2004). Epizootiology of hemorrhagic disease in mule deer in central Arizona. *J. Wildl. Dis.*, **40**, 119–124.
- ESCHBAUMER M., WERNIKE K., BATTEN C.A., SAVINI G., EDWARDS L., DI GENNARO A., TEODORI L., OURA C.A., BEER M. & HOFFMANN B. (2012). Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 7 in European cattle and sheep: diagnostic considerations and effect of previous BTV exposure. *Vet. Microbiol.*, **159**, 298–306.
- GARD G.P. & MELVILLE L.F. (1992). Results of a decade's monitoring for orbiviruses in sentinel cattle pastured in an area of regular arbovirus activity in northern Australia. In: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses, Walton T.E. & Osburn B.I., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 85–89.
- GARD G.P., MELVILLE L.F. & SHORTHOSE J.E. (1989). Investigations of bluetongue and other arboviruses in the blood and semen of naturally infected bulls. *Vet. Microbiol.*, **20**, 315.
- LUO L.Z. & SABARA M.I. (2005). Production of a recombinant major inner capsid protein for serological detection of epizootic hemorrhagic disease virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **12**, 904–909.
- MAAN N.S., MAAN S., NOMIKOU K., JOHNSON D.J., EL HARRAK M., MADANI H., YADIN H., INCOGLU S., YESILBAG K., ALLISON A.B., STALLKNECHT D.E., BATTEN C., ANTHONY S.J. & MERTENS P.P.C. (2010). RT-PCR assays for seven serotypes of epizootic haemorrhagic disease virus & their use to type strains from the Mediterranean region and North America. *PLoS One*, **5**, e12782.
- MACLACHLAN N.J. & OSBURN B.I. (2004). Epizootic haemorrhagic disease of deer. In: Infectious Diseases of Livestock, Volume 2, Second Edition, Coetzer J.A.W. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press Southern Africa, Cape Town, South Africa, 1227–1230.
- MECHAM J.O. & JOCHIM M.M. (2000). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to epizootic hemorrhagic disease of deer virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **12**, 142–145.
- MECHAM J.O. & WILSON W.C. (2004). Antigen capture competitive enzyme-linked immunosorbent assays using baculovirus-expressed antigens for diagnosis of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 518–523.
- MELLOR P.S., CARPENTER S., HARRUP L., BAYLIS M. & MERTENS P.P.C. (2008). Bluetongue in Europe and the Mediterranean Basin: History of occurrence prior to 2006. *Prev. Vet. Med.*, **87**, 4–20.
- NOON T.H., WESCHE S.L., HEFFELFINGER J., FULLER A., BRADLEY G.A. & REGGIARDO C. (2002). Hemorrhagic disease in deer in Arizona. *J. Wildl. Dis.*, **38**, 177–181.
- OHASHI S., YOSHIDA K., WATANABE Y. & TSUDA T. (1999). Identification and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a variant of the Ibaraki virus from naturally infected cattle and aborted fetuses in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 3800–3803.
- PEARSON J.E., GUSTAFSON G.A., SHAFER A.L. & ALSTAD A.D. (1992). In: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses, Walton T.E. & Osburn B.I., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 533–546.
- QUIST C.F., HOWERTH E.W., STALLKNECHT D.E., BROWN J., PISELL T. & NETTLES V.F. (1997). Host defense responses associated with experimental hemorrhagic disease in white-tailed deer. *J. Wildlife Dis.*, **33**, 584–599.
- SAIF L.J. (2011). Reoviridae. In: Fenner's Veterinary Virology, Fourth Edition, MacLachlan N.J. & Dubovi E.J., eds. Academic Press, London, UK.
- SAVINI G., AFONSO A., MELLOR P., ARADAIB I., YADIN H., SANAA M., WILSON W., MONACO F. & DOMINGO M. (2011). Epizootic haemorrhagic disease virus. *Res. Vet. Sci.*, **91**, 1–17.
- SCHWARTZ-CORNIL I., MERTENS P.P., CONTRERAS V., HEMATI B., PASCALE F., BREARD E., MELLOR P.S., MACLACHLAN N.J. & ZIENTARA S. (2008). Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet. Res.*, **39**, 46.
- STALLKNECHT D.E. & HOWERTH E.W. (2004). Epidemiology of bluetongue and epizootic haemorrhagic disease in wildlife: surveillance methods. *Vet. Ital.*, **40**, 203–207.
- ST GEORGE T.D., CYBINSKI D.H., STANDFAST H.A., GARD G.P. & DELLA-PORTA A.J. (1983). The isolation of five different viruses of the epizootic haemorrhagic disease of deer serogroup. *Aust. Vet. J.*, **60**, 216–217.

TEMIZEL E.M., YESILBAG K., BATTEN C., SENTURK S., MAAN N.S., CLEMENT-MERTENS P.P. & BATMAZ H. (2009). Epizootic hemorrhagic disease in cattle, western Turkey. *Emerg. Inf. Dis.*, **15**, 317–319.

THEVASAGAYAM J.A., WELLBY M.P., MERTENS P.P.C., BURROUGHS J.N. & ANDERSON J. (1996). Detection and differentiation of epizootic haemorrhagic disease of deer and bluetongue viruses by serogroup specific sandwich ELISA. *J. Virol. Methods*, **56**, 49–57.

WHITE J.R., BLACKSELL S.D., LUNT R.A. & GARD G.P. (1991). A monoclonal antibody blocking ELISA detects antibodies specific for epizootic haemorrhagic disease virus. *Vet. Microbiol.*, **29**, 237–250.

WILSON W.C. (1994). Development of a nested-PCR test based on sequence analysis of epizootic hemorrhagic disease viruses non-structural protein 1 (NS1). *Virus Res.*, **31**, 357–365.

WILSON W.C., HINDSON B.J., O'HEARN E.S., HALL S.J., TELLEGREN-ROTH C., TORRES C., MECHAM J.O. & LENHOFF R.J. (2009). A multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus serogroups. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **21**, 760–770.

YIN H., ZHANG H., SHI L., YANG S., ZHANG G., WANG S. & ZHANG J. (2010). Detection and quantitation of bluetongue virus serotypes by a TaqMan probe-based real-time RT-PCR and differentiation from epizootic hemorrhagic disease virus. *J. Virol. Methods*, **108**, 237–241.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Enfermedad hemorrágica epizootica (puede consultarse en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>). Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la enfermedad hemorrágica epizootica.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2014.