

RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA / VULVOVAGINITIS PUSTULAR INFECCIOSA

RESUMEN

Descripción de la enfermedad: La rinotraqueítis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustular infecciosa (RIB/VPI), causada por el herpesvirus bovino tipo 1 (HVBo-1), es una enfermedad del ganado bovino doméstico y salvaje. El virus tiene una distribución mundial, pero se ha erradicado de varios países europeos y otros disponen de programas activos de erradicación.

La enfermedad se caracteriza por signos clínicos de las vías respiratorias altas, como secreción nasal (muco)purulenta, hiperemia del hocico (enfermedad de la nariz roja) y conjuntivitis. Los signos de enfermedad general son fiebre, depresión, falta de apetito, abortos y reducción de la producción de leche. El virus también puede infectar el tracto genital y causar vulvovaginitis pustulosa y balanopostitis. En los exámenes post-mortem se observa rinitis, laringitis y traqueítis. La mortalidad es baja, y la mayoría de infecciones siguen un curso subclínico. En caso de infecciones bacterianas secundarias, estas pueden conllevar una enfermedad respiratoria más grave, y el HVBo-1 podría intervenir en enfermedades multifactoriales como la “fiebre del transporte”.

Identificación del agente: El virus se puede aislar de hisopos nasales o genitales de animales con signos respiratorios, vulvovaginitis o balanopostitis, tomados durante la fase aguda de la infección, y, en casos graves, de distintos órganos extraídos post-mortem. Tras la infección, el HVBo-1 puede persistir en animales infectados en un estado latente en neuronas sensitivas, como por ejemplo en los ganglios trigémino o sacro. El virus se puede reactivar, lo cual dará lugar a una excreción de virus (re-excreción) sin que el animal presente enfermedad clínica. Dado este fenómeno de latencia, los animales positivos a las pruebas de anticuerpos deben clasificarse como infectados por el HVBo-1 (con dos excepciones: respuestas serológicas inducidas por la vacunación con una vacuna inactivada, o bien por anticuerpos del calostro).

Para el aislamiento del virus, se utilizan distintos cultivos celulares de origen bovino, como células pulmonares o renales secundarias o la línea de células renales bovinas Madin-Darby (MDBK). El virus produce un efecto citopático en 2-4 días. Se define mediante métodos de neutralización o de detección de antígeno utilizando antisueros monoespecíficos o anticuerpos monoclonales. A continuación, las cepas del HVBo-1 pueden subtipificarse mediante análisis del ADN por enzimas de restricción (RFLP) en los subtipos 1.1 o 1.2. Las cepas del HVBo-1.2 pueden, a su vez, clasificarse en 2a o 2b. La aparición de rinotraqueítis o vulvovaginitis/balanopostitis depende más de la vía de infección que del subtipo del virus. El virus anteriormente denominado HVBo-1.3, un agente neuropatógeno, ahora se clasifica como HVBo-5.

Para la detección del ADN vírico, la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cada vez se utiliza más en el diagnóstico sistemático, sobre todo la PCR en tiempo real.

Pruebas serológicas: La prueba de la neutralización del virus y distintos ensayos inmunológicos (ELISA indirecto o de bloqueo) son las pruebas que más se utilizan para la detección de anticuerpos. Con los ELISA, pueden detectarse anticuerpos en suero o plasma, y con una menor sensibilidad, en muestras de leche de o de leche de tanque. El uso de un ELISA de detección de anticuerpos contra gE permite diferenciar entre el ganado bovino infectado por virus natural y el ganado bovino vacunado con una vacuna marcada mediante la supresión de gE (estrategia DIVA).

Requisitos par alas vacunas: Se dispone de vacunas inactivadas y de vacunas vivas atenuadas. Las vacunas protegen al ganado bovino clínicamente en caso de infección y reducen

considerablemente la posterior excreción del virus natural. Aunque la vacunación podría no prevenir la infección por el virus natural en algunos animales, la diseminación del virus natural en rebaños infectados se reduce de modo eficaz. Las vacunas no deben inducir enfermedad, aborto ni ninguna reacción local ni sistémica, y deben ser genéticamente estables. Hoy en día, en general se dispone de vacunas frente al HVBo-1 cuyo marcador es una mutación que consiste en la supresión del gen de la glicoproteína E (vivas o inactivadas) y que pueden utilizarse como parte de una estrategia DIVA.

A. INTRODUCCIÓN

La rinotraqueítis bovina infecciosa/vulvovaginitis pustulosa infecciosa (RBI/VPI), causada por el herpesvirus bovino tipo 1 (HVBo-1), es una enfermedad del Ganado bovino doméstico y salvaje. El HVBo-1 forma parte del género *Varicellovirus*, en la subfamilia Alphaherpesvirinae, que pertenece a la familia Herpesviridae, en el orden Herpesvirales. El genoma vírico consiste en un ADN bicatenario que codifica unas 70 proteínas, de las cuales se han identificado 33 estructurales y más de 15 no estructurales. Las glicoproteínas víricas, que se encuentran en la envoltura de la superficie del virión, intervienen de forma importante en la patogenia y la inmunidad. El HVBo-1 puede pertenecer al subtipo 1.1, al 1.2a o al 1.2b (Metzler *et al.*, 1985). Los subtipos HVBo-1.2 pueden ser menos virulentos que el subtipo 1.1 (Edwards *et al.*, 1990). El anteriormente denominado HVBo-1.3, que puede actuar como agente neuropatógeno en los terneros, se ha reclasificado como HVBo-5 (Magyar *et al.*, 1993). El HVBo-1 presenta una estrecha relación antigénica y genética con otros alfa herpesvirus de los rumiantes: el HVBo-5, el herpesvirus caprino 1, el herpesvirus de los cérvidos tipo 1 (ciervo común), el herpesvirus de los cérvidos tipo 2 (reno), herpesvirus de los búfalos tipo 1 y el herpesvirus del alce tipo 1 (Thiry *et al.*, 2006).

Tras un periodo de incubación de 2–4 días, se observa secreción nasal serosa, salivación, fiebre, falta de apetito y depresión. En unos pocos días, las secreciones nasal y ocular pasan a ser mucopurulentas. Cuando se practica la monta natural, la infección genital puede conllevar vulvovaginitis pustulosa o balanopostitis. Sin embargo, la mayoría de infecciones cursan de forma muy leve o subclínica (Van Oirschot *et al.*, 1993). Los casos no complicados de enfermedad respiratoria o genital causada por el HVBo-1 duran 5 a 10 días. En caso de infección vírica o bacteriana secundaria, esta puede contribuir a que aparezca un complejo patógeno multifactorial que dé lugar a enfermedad respiratoria grave en animales de corta edad (“fiebre del transporte” o del “hacinamiento”).

Tras la infección transmitida por el aire, el HVBo-1 se replica a altos títulos en mucosas de las vías respiratorias altas y en las amígdalas. A continuación, el virus se disemina a las conjuntivas y alcanza los ganglios trigéminos por transporte axonal neuronal. Tras la infección genital, el HVBo-1 se replica en la mucosa vaginal o prepucial, y queda latente en los ganglios sacros. El ADN vírico permanece en las neuronas de los ganglios, probablemente durante toda la vida del hospedador (estado latente). En caso de estrés, como en el momento del transporte o el parto, pero también al aplicar corticosteroides, se puede inducir la reactivación de la infección latente. Como consecuencia, el virus podría pasar de crear una infección latente a una lítica, y podría excretarse de modo intermitente al medio y transmitirse a los animales que contacten con los infectados.

La infección por el HVBo-1 desencadena una respuesta de anticuerpos y una respuesta inmunitaria celular en un plazo de 7–14 días. La respuesta inmunitaria se considera que persiste de por vida, aunque podría quedar por debajo del límite de detección de algunas pruebas pasados unos años. Los anticuerpos maternos se pasan al ternero por el calostro, que a continuación queda protegido frente a la enfermedad clínica que induce el HVBo-1 (Mechor *et al.*, 1987). Los anticuerpos maternos tienen una semivida biológica de unas 3 semanas, pero en ocasiones se pueden detectar en animales durante varios meses.

El virus tiene una distribución mundial, a excepción de los países libres del HVBo-1, paralela a la distribución del ganado bovino doméstico. Otros *Artiodactyla* (como cabras, ovejas, búfalos acuáticos o camélidos) pueden resultar infectados por el HVBo-1. Tras la infección, se detecta excreción del virus por vía nasal durante 5–14 días, con títulos pico de 10^8 – 10^{10} DICT₅₀ (dosis infectantes al 50% en cultivo de tejido) por ml de secreción nasal. El semen de un toro infectado puede contener HVBo-1, y por tanto el virus se puede transmitir tanto mediante monta natural como mediante inseminación artificial (Parsonson & Snowdon, 1975).

Las vacunas suelen prevenir la aparición de signos clínicos y reducen de forma importante la excreción de virus tras la infección, pero no previenen por completo la infección. En distintos países se han llevado a cabo o se están aplicando actualmente varias campañas de erradicación, como programas de detección y retirada de animales positivos y/o campañas de vacunación (véase el apartado C).

Puede sospecharse de infección por el HVBo-1 a partir de hallazgos clínicos, anatomopatológicos y epidemiológicos. No obstante, para llegar a un diagnóstico definitivo, es necesario realizar pruebas de laboratorio (serología y/o detección del virus). Un procedimiento diagnóstico completo de laboratorio tiene por objetivo

detectar el virus causal (o componentes víricos) y los anticuerpos específicos que induce. Sin embargo, dada la infección latente inducida por el HVBo-1, la detección de anticuerpos podría ser suficiente para determinar el estado de animales concretos respecto al HVBo-1.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico del HVBo-1 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						
Aislamiento del virus	–	+ ²	+	++	–	–
PCR en tiempo real	–	+ ²	+	+++	–	–
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA	+++	+++	+++	++	+++	+++
VN	++	++	++	+	++	++

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

ELISA = enzimoimmunoanálisis; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; VN = prueba de neutralización vírica

1. Identificación del agente patógeno

1.1. Obtención y procesado de las muestras

Se recogen hisopos nasales, preferiblemente de espuma o de algodón, de varios animales afectados (de cinco a diez) en la primera fase de la infección. Este ganado todavía mostrará una rinorrea serosa en vez de mucopurulenta. En los casos de vulvovaginitis o balanopostitis se toman hisopos de los genitales. Los hisopos deben frotarse vigorosamente contra las superficies mucosas. También se puede lavar el prepucio con solución salina y recoger el líquido de lavado. Las muestras se suspenden en un medio de transporte (un medio de cultivo celular que contenga antibióticos y 2–10% de suero fetal bovino sin HVBo-1 para evitar la inactivación de los virus), se enfrían a 4°C y se envían rápidamente al laboratorio.

En la necropsia, se recogen para la detección del virus las mucosas del tracto respiratorio y porciones de las amígdalas, pulmones y ganglios linfoides bronquiales. En casos de aborto, se examina el hígado, los pulmones, el bazo, el riñón fetales, así como cotiledones placentarios. Las muestras se deben enviar al laboratorio en hielo con la mayor rapidez posible.

Después de su llegada al laboratorio a temperatura ambiente durante 30 minutos en el medio de transporte para eluir el virus. Después de extraer los hisopos se clarifica el medio de transporte por centrifugación a 1.500 **g** durante 10 minutos. Los tejidos se homogeneizan para formar suspensiones al 10–20% (p/v) en medio de cultivo celular antes de centrifugar a 1.500 **g** durante 10 minutos. Los sobrenadantes de estas muestras se filtran a través de filtros de 0,45 µm y se utilizan para el aislamiento de virus.

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

2 Método especialmente aplicable al análisis de semen.

El aislamiento de virus a partir del semen requiere algunas adaptaciones particulares, porque el líquido seminal contiene enzimas y otros factores que son tóxicos para las células e inhiben la replicación del virus (ver más adelante).

1.2. Aislamiento vírico

Para aislar los virus, se pueden utilizar células de distintos orígenes. Resultan adecuadas las células primarias o secundarias de riñón, de pulmón o de testículos bovinos, las cepas celulares derivadas de pulmón fetal bovino, de cornetes nasales o de tráquea, y las líneas celulares establecidas, como la línea celular Madin–Darby de riñón bovino (MDBK). Los cultivos celulares pueden cultivarse en tubos de vidrio o de plástico, en placas o en discos. Cuando se utilizan placas de plástico de 24 pocillos, se inoculan en estos cultivos celulares 100–200 µl de los sobrenadantes descritos anteriormente. Después de un período de absorción de 1 hora, se lavan los cultivos y se añade medio de mantenimiento. El suero empleado como suplemento del medio en el medio de mantenimiento debe estar libre de anticuerpos contra el HVBo-1. Si observa a diario si los cultivos celulares presentan ECP, que normalmente aparece a los tres días de la inoculación. Se caracteriza por agrupaciones de células redondeadas en forma de racimos que se juntan alrededor de un hueco en la monocapa; a veces, se pueden observar células gigantes con varios núcleos. Se requiere experiencia para reconocer este aspecto característico. Si después de 7 días no aparece el ECP, se debe realizar un pase ciego. El cultivo celular se congela y se descongela, se clarifica por centrifugación, y se usa el sobrenadante para inocular monocapas recién preparadas (Brunner *et al.*, 1988; Edwards *et al.*, 1983).

Para identificar como HVBo-1 el virus aislado, el sobrenadante del cultivo debe neutralizarse con un antisuero monoespecífico contra el HVBo-1 o con un anticuerpo monoclonal (MAb) neutralizante. Con este fin, se llevan a cabo diluciones decimales del sobrenadante problema y se añade a cada dilución un antisuero monoespecífico contra HVBo-1 o un suero negativo como control. Después de incubar a 37°C durante 1 hora, se inoculan las muestras en un cultivo celular; a los 3–5 días se calcula el índice de neutralización. El índice de neutralización es el título del virus (en log₁₀) en presencia de suero control negativo, menos el título del virus en presencia del antisuero específico. Si el índice de neutralización es mayor de 1,5, se puede considerar que la cepa es HVBo-1. Para acortar el procedimiento de aislamiento del virus, se pueden inocular dos muestras en cultivo celular: una que se haya preincubado con antisuero monoespecífico y otra que se haya incubado con el suero control negativo. Si el antisuero monoespecífico inhibe el ECP, se puede considerar que la cepa es HVBo-1, aunque para una confirmación definitiva sería necesaria una caracterización molecular para diferenciarla de alfa herpesvirus de rumiantes relacionados.

Un método alternativo de identificación del virus consiste en la verificación directa del antígeno del HVBo-1 en las células próximas al ECP mediante una prueba de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa (Kaashoek *et al.*, 1994) con un antisuero monoespecífico o con MAb conjugado. Además, el sobrenadante se puede utilizar como molde para la prueba del polimorfismo en la longitud de los fragmentos obtenidos mediante endonucleasa de restricción (RFLP) (véase el apartado B.1.5) y para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véase el apartado B.1.3).

1.2.1. Aislamiento del virus del semen

Se deben analizar 0,05 a 0,1 ml de semen fresco natural con dos pases en un cultivo celular. El semen natural en general es citotóxico y debe prediluirse (por ejemplo, a 1/10) antes de añadirlo a los cultivos celulares. A veces puede surgir un problema similar con el semen conservado. En el caso del semen conservado, debe realizarse una aproximación para garantizar que se está analizando el equivalente de, como mínimo, 0,1 ml de semen fresco natural (por ejemplo, un mínimo de 0,5 ml de semen conservado). Es posible que sea necesario analizar varias muestras diluidas con este método para alcanzar un volumen equivalente a 0,1 ml de semen fresco natural (por ejemplo, 5 x 1 ml de una muestra de semen conservado diluida a 1/10). A continuación se detalla un procedimiento analítico adecuado. Véase también Brunner *et al.* (1988).

1.2.1.1. Procedimiento analítico

- i) Se diluyen 200 µl de semen fresco natural en 2 ml de suero fetal bovino (sin anticuerpos contra el HVBo-1) con antibióticos.
- ii) Se mezcla enérgicamente y se deja a temperatura ambiente 30 minutos.
- iii) Se inocula 1 ml de la mezcla semen/suero en una monocapa de células sensibles (véase “Aislamiento del virus, arriba) en una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos.
- iv) Se incuban las placas durante 1 hora a 37°C.

- v) Se elimina la muestra, se lava dos veces la monocapa con 5 ml de medio de mantenimiento, y se añaden 5 ml de medio de mantenimiento a cada pocillo
- vi) Se incluyen en la prueba controles negativos y positivos para el HVBo-1. Se ha de tener mucho cuidado para evitar la contaminación de los pocillos problema con el control positivo; por ejemplo, manipulando el control siempre al final, y utilizando placas independientes.
- vii) A diario se observan las placas al microscopio para comprobar si aparece ECP. Si aparece el ECP, se realizan pruebas confirmativas para HVBo-1 por métodos de neutralización específica o de inmunomarcaje (véase arriba).
- viii) Si después de 7 días no se observa el ECP, los cultivos se congelan y se descongelan, se clarifican por centrifugación, y se utiliza el sobrenadante para inocular nuevas monocapas.
- ix) La muestra se considera negativa si no se pone de manifiesto el ECP a los 7 días de la incubación de los cultivos del nuevo pase.

1.3. Detección del ácido nucleico

En la última década se han descrito varios métodos para demostrar la presencia del ADN del HVBo-1 en muestras clínicas, incluyendo la hibridación ADN-ADN y la PCR. La utilización de la PCR en el diagnóstico sistemático está aumentando (Moore *et al.*, 2000). En comparación con el aislamiento de virus, la PCR tiene la ventaja principal de que es más sensible y más rápida: puede realizarse en 1–2 días. También puede detectar ADN episódico de virus no replicante en ganglios sensitivos (Van Engelenburg *et al.*, 1993), como el ganglio trigémino, en la fase latente de la infección. El inconveniente es que los análisis mediante PCR son fáciles de contaminar y, por consiguiente, hay que tomar medidas para evitar falsos positivos. El riesgo de contaminación disminuye notablemente con las nuevas técnicas de la PCR, como la denominada PCR en tiempo real o cuantitativa (véase abajo) (Abril *et al.*, 2004; Lovato *et al.*, 2003; Wernike *et al.*, 2011) y el método de la PCR se recomienda en todos los casos para la detección directa del HVBo-1.

Hasta la fecha la PCR se ha utilizado principalmente para detectar ADN del HVBo-1 en muestras de semen infectado artificial (Kramps *et al.*, 1993) o naturalmente (Van Engelenburg *et al.*, 1993). Es importante optimizar cuidadosamente las condiciones de la PCR, incluyendo la preparación de las muestras, la concentración de componentes analíticos, como por ejemplo, los cebadores y la polimerasa, y los programas de ciclos. La región a amplificar debe estar presente en todas las cepas del HVBo-1 y la secuencia nucleotídica debe estar conservada. Se han utilizado los genes TK, gB, gC, gD y gE como dianas para la amplificación mediante la PCR. Para diferenciar entre un virus natural y las cepas vacunales con el gen gE suprimido, se pueden utilizar las PCR basadas en la detección de las secuencias de gE (Fuchs *et al.*, 1999; Schynts *et al.*, 1999; Wernike *et al.*, 2011). Discriminar entre la infección por cepas virulentas de la RIB y la infección por cepas vivas atenuadas (no marcadoras) puede no lograrse con facilidad con la técnica de la PCR, de modo que para ello puede utilizarse la RFLP o la secuenciación de alto rendimiento (HTS). Se han desarrollado PCR específicas que permiten discriminar entre HVBo-1, HVBo-5 y otros alfaherpesvirus relacionados (Ashbaugh *et al.*, 1997; Ros *et al.*, 1999).

Experimentalmente, la PCR resulta más sensible que el aislamiento del virus: en muestras de semen obtenido a partir de toros infectados y conservado en yema de huevo, se detectó con la PCR un número de muestras positivas cinco veces mayor que con el aislamiento del virus (Van Engelenburg *et al.*, 1995). El límite de detección de las PCR validadas es de unas pocas copias del genoma por reacción de PCR. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de falsos negativos. Para identificar los posibles falsos negativos, se recomienda introducir un ADN molde como control interno en el tubo de reacción de la muestra del semen, que se amplifique con los mismos cebadores. Tal ADN molde de control se puede construir insertando, por ejemplo, un fragmento de 100 pares de bases en la región analizada. Este molde control también hace posible semicuantificar la cantidad de ADN detectada (Ros *et al.*, 1999; Van Engelenburg *et al.*, 1993). Cuando se está utilizando un control interno, es necesaria una prueba extensa para garantizar que la amplificación por PCR del control interno añadido no compite con la PCR diagnóstica y, por lo tanto, disminuye la sensibilidad analítica (véase también el capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*). La extracción de ADN y la calidad de las preparaciones de ADN también se pueden controlar mediante amplificación de secuencias celulares (genes de mantenimiento, Wernike *et al.*, 2011) o añadiendo secuencias de ADN "artificial" antes de los procedimientos de extracción (como el gen de la proteína fluorescente verde o virus no relacionados con el HVBo) y controles internos. Para mejorar la sensibilidad y la especificidad de la PCR del HVBo-1, los sistemas de PCR en tiempo real son los de elección.

1.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Se ha desarrollado el siguiente método analítico mediante PCR en tiempo real para detectar el HVBo-1 en semen bovino conservado destinado al comercio. Se ha validado el método tal como se describe en el capítulo 1.1.6, lo que implica una comparación internacional interlaboratorial exhaustiva entre seis laboratorios colaboradores considerados especialistas en pruebas para la IBR (Wang *et al.*, 2008).

En varios estudios se ha puesto de manifiesto que las pruebas de la PCR son más sensibles que el aislamiento del virus (Smits *et al.*, 2000; Van Engelenburg *et al.*, 1995; Vilcek *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2008; Wiedmann *et al.*, 1993). Se ha utilizado la PCR en tiempo real para la detección de HVBo-1 y HVBo-5 en ganado y ratones infectados de forma experimental (Abril *et al.*, 2004; Lovato *et al.*, 2003), y se han utilizado varias pruebas de la PCR convencional para la detección del ADN del HVBo-1 en muestras de semen bovino infectado de forma natural o artificial (Deka *et al.*, 2005; Grom *et al.*, 2006; Masri *et al.*, 1996; Van Engelenburg *et al.*, 1993; Weiblen *et al.*, 1992; Wiedmann *et al.*, 1993; Xia *et al.*, 1995). La detección convencional de los productos de la amplificación mediante PCR se basa en el análisis mediante electroforesis en gel (Rola *et al.*, 2003). Se han seleccionado cebadores específicos de secuencia para amplificar las diferentes partes del gen conservado de la glicoproteína del genoma del BHV-1, que incluye el gen de la glicoproteína B (gB) (Grom *et al.*, 2006; Santurde *et al.*, 1996), el gen de la gC (Smits *et al.*, 2000; Van Engelenburg *et al.*, 1995), el gen de la gD (Smits *et al.*, 2000; Wiedmann *et al.*, 1993), el gen de la gE (Grom *et al.*, 2006), y el gen de la timidina quinasa (tk) (Moore *et al.*, 2000; Yason *et al.*, 1995). Asimismo, en 2011, se validó y se dio a conocer una PCR en tiempo real triple para la detección de los genes de la gD y de la gE del HVBo-1 junto con un gen de mantenimiento (Wernike *et al.*, 2011). Esta PCR también permite una diferenciación fácil y rápida entre cepas naturales del HVBo-1 y cepas vacunales en las que se ha suprimido el gen de la gE.

En la PCR en tiempo real que aquí se describe se utilizan un par de cebadores específicos de secuencia para la amplificación del ADN diana y una sonda para la nucleasa 5' para la detección de los productos amplificados. La oligosonda es un solo oligonucleótido específico de secuencias marcado con dos fluoróforos diferentes, el aceptante/donante, 5-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5', y el aceptante/"quencher" 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA) en el extremo 3'. Esta prueba de la PCR en tiempo real está diseñada para detectar el ADN vírico de las cepas del HVBo-1, incluidos los subtipos 1 y 2, de semen bovino conservado. Con la prueba se amplifica de forma selectiva una secuencia de 97 pares de bases del gen de la glicoproteína B (gB). Los detalles de los cebadores y las sondas se ofrecen en el protocolo esbozado a continuación.

1.3.1.1. Preparación de la muestra, equipo y reactivos

- i) Las muestras típicas utilizadas en la prueba son de semen bovino conservado guardadas en nitrógeno líquido. Esas muestras se pueden transportar al laboratorio en nitrógeno líquido, o se pueden enviar a 4°C, y guardar en nitrógeno líquido a -70°C (durante un largo periodo de tiempo) o a 4°C (durante un corto periodo de tiempo). El hecho de guardar el semen a 4°C durante un corto periodo de tiempo (hasta 7 días) no parece afectar al resultado de la prueba de la PCR.
- ii) Se procesan tres pajuelas de cada lote de semen. Se deben realizar por duplicado las amplificaciones por PCR para cada preparación de ADN (un total de seis amplificaciones) para asegurar la detección del ADN en las muestras que contienen niveles bajos de virus.
- iii) La prueba de la PCR en tiempo real que aquí se describe consta de dos procedimientos distintos. En primer lugar se extrae el ADN del HVBo-1 del semen utilizando resina quelatante Chelex-100, junto con proteinasa K y DL-Ditiotreitol (DTT). El segundo procedimiento consiste en el análisis mediante PCR del molde de ADN extraído en una mezcla de reacción para PCR en tiempo real: existen varios kits comerciales de amplificación por PCR en tiempo real, y que el kit seleccionado debe ser compatible con la plataforma de la PCR en tiempo real con la que se trabaje). Los cebadores y sondas requeridas pueden ser sintetizados por varias compañías comerciales.

1.3.1.2. Extracción de ADN

- i) En un tubo de 1,5 ml con tapón de rosca se introduce:
- | | |
|--|---------|
| Chelex 100 sodio (10% p/v en agua desionizada destilada) | 100 µl. |
| Proteinasa K (10 mg/ml) | 11,5 µl |
| DL-Ditiotreitol (1 M) | 7,5 µl |
| Agua sin nucleasa | 90 µl |
| Muestra de semen | 10 µl |
- Se mezcla suavemente pipeteados³.
- ii) Las muestras se incuban a 56°C durante 30 minutos y después se someten a vórtex a alta velocidad 10 segundos.
- iii) A continuación, se incuban los tubos en un baño de agua hirviendo 8 minutos y se somete al vórtex a alta velocidad 10 segundos.
- iv) Los tubos se centrifugan a 10.000 **g** 3 minutos.
- v) El supernadante⁴ se transfiere a un nuevo microtubo y puede utilizarse directamente para la PCR, o guardarse a -20°C.

1.3.1.3. Preparación de los reactivos

Deben seguirse las instrucciones del fabricante para la aplicación y conservación de la mezcla de reacción para la PCR en tiempo real.

Las soluciones base de trabajo para cebadores y sonda se preparan con agua libre de nucleasa a una concentración de 4,5 µM y 3 µM, respectivamente. Las soluciones base se guardan a -20°C y la solución con la sonda debe guardarse en la oscuridad. Se pueden preparar alícuotas de un solo uso para reducir la congelación/descongelación de los cebadores y las sondas y prolongar su periodo de validez.

1.3.1.4. Procedimiento analítico de la PCR en tiempo real

i) *Secuencias de los cebadores y la sonda*

Los cebadores y sonda elegidos se indican en Abril *et al.* (2004) y se describen a continuación.

Cebador gB-F: 5'-TGT-GGA-CCT-AAA-CCT-CAC-GGT-3' (posición 57499–57519 GenBank®, número de acceso AJ004801)

Cebador gB-R: 5'-GTA-GTC-GAG-CAG-ACC-CGT-GTC-3' (posición 57595–57575 GenBank®, número de acceso AJ004801)

Sonda marcada: 5'-FAM-AGG-ACC-GCG-AGT-TCT-TGC-CGC-TAMRA-3' (posición 57525–57545 GenBank®, número de acceso AJ004801)

ii) *Preparación de muestras de reacción*

Las mezclas de reacción para la PCR se preparan en una sala de laboratorio aparte. Para cada prueba de PCR, deben incluirse los controles adecuados. Como mínimo, debe incluirse un control no molde (NTC, solo reactivos), controles negativos adecuados, es decir, 1 por cada 10 muestras problema, y dos controles positivos (un positivo moderado y un positivo fuerte). Cada muestra problema y control se analiza por duplicado. Las amplificaciones mediante PCR se llevan a cabo en un volumen de 25 ml.

3 Es importante que el sodio con Chelex 100 sea homogéneo al pipetearlo, puesto que el sodio con Chelex 100 no es soluble. esto se puede lograr colocando el recipiente que contiene la solución Chelex 100 en un agitador magnético mientras se pipetea.

4 Algunas muestras de ADN pueden volverse turbias y en ocasiones se puede formar una fina membrana blanca tras la congelación y descongelación. Esto no parece influir en el rendimiento de la PCR. No es necesario calentar ni volver a centrifugar las muestras.

- a) Se añaden mezclas de reactivos para PCR en una sala limpia (en este lugar no deben manipularse cultivos víricos, extractos de ADN ni productos post-amplificación)

2 x mezcla de reacción para PCR en tiempo real	12,5 µl
Tinción de referencia ROX (opcional)	0,5 µl
Cebador directo (gB-F, 4,5 µM)	1 µl
Cebador inverso (gB-R, 4,5 µM)	1 µl
Sonda (3 µM)	1 µl
Agua libre de nucleasa	4 µl

- b) Se añaden 5 µl de ADN molde a la mezcla de reactivos para PCR hasta un volumen final de 25 µl. Se preparan muestras de ADN y se añaden a la mezcla para PCR en otra sala.

- iii) Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Se colocan tubos de PCR en el sistema de detección por PCR en tiempo real en una sala independiente diseñada para la PCR. El sistema de detección mediante PCR se programa para la prueba del siguiente modo:

Parámetros de Reacción de la PCR (pueden variar en función de la plataforma de PCR)

Un ciclo:	Mantenimiento a 50°C	2 minutos
Un ciclo:	Mantenimiento a 95°C	2 minutos
45 ciclos:	Mantenimiento a 95°C	15 segundos
	Mantenimiento a 60°C	45 segundos

- iv) Análisis de datos mediante PCR en tiempo real

El umbral suele ajustarse según las instrucciones del fabricante para el software de análisis escogido. Como alternativa, al mismo tiempo pueden analizarse muestras de semen negativas al aislamiento vírico, obtenidas de animales seronegativos, para determinar la señal de fondo asociada al sistema de detección utilizado.

1.3.1.5. Interpretación de los resultados

- i) Controles de la prueba

En cada prueba de PCR deben incluirse los controles positivos y negativos, así como reactivos control. Como control negativo, puede utilizarse el semen negativo procedente de toros seronegativos. Como control positivo, es preferible utilizar el semen positivo de toros infectados de forma natural. No obstante, puede resultar difícil de obtener. Como alternativa, los controles positivos pueden obtenerse de semen negativo al que se añaden cantidades conocidas de HVBo-1.

- ii) Resultados de la prueba

Resultado positivo: Cualquier muestra que tenga un valor de ciclo umbral (Ct) igual o inferior a 45 asociado a una curva de amplificación se considera positiva. El control positivo debe tener un valor Ct dentro de un rango aceptable (± 3 valores de Ct) como se haya establecido previamente mediante pruebas de repetibilidad. Para minimizar el riesgo de contaminación por el control positivo, debe utilizarse una dilución que dé lugar a un valor de Ct de entre 30 y 33.

Resultado negativo: Cualquier muestra que no tenga un valor Ct se considera negativa. El control negativo y el control no molde no deben tener valores Ct.

1.4. Detección del antígeno vírico

A partir de hisopos nasales, oculares o genitales pueden prepararse frotis directamente sobre cubreobjetos, o bien, tras una centrifugación, pueden instilarse gotas del depósito celular (véase el apartado B.1.1) sobre cubreobjetos. Estos cubreobjetos se someten a la prueba de la inmunofluorescencia directa o indirecta estándar. En una prueba de inmunofluorescencia directa, el antisuero mono-específico se conjuga a una tinción fluorescente, como el isotiocianato de fluoresceína (ITCF), mientras que en el procedimiento indirecto, el anticuerpo secundario contra la inmunoglobulina anti-especie se conjuga a un fluorocromo. Para obtener resultados fiables, es necesario tomar

muestras de varios animales de un rebaño que tengan fiebre y presenten una ligera rinorrea serosa. Los frotis deben secarse al aire y fijarse en acetona. Los frotis de hisopos nasales de ganado bovino con secreción nasal purulenta o hemorrágica a menudo son negativos (Terpstra, 1979). La ventaja de este procedimiento es inferior que la del aislamiento vírico (Edwards *et al.*, 1983) o la de la PCR. Deben incluirse controles positivos y negativos en cada prueba.

Pueden comprobarse si en los tejidos recogidos post-mortem hay antígeno anti HVBo-1 mediante análisis de inmunofluorescencia de cortes congelados. También podría aplicarse inmunohistoquímica para la detección del HVBo-1 y para la determinación de la presencia de antígeno en los tejidos. En cuanto a los MAbs, cada vez se utilizan más para detectar el antígeno HVBo-1, lo cual comporta una mejora de la especificidad de la prueba. No obstante, estos MAbs debe escogerse cuidadosamente, porque deben dirigirse contra epítomos conservados que están presentes en todas las cepas del HVBo-1.

Otra posibilidad para la detección rápida directa del antígeno vírico es utilizar un ensayo inmunoanálisis (ELISA). Puede capturarse antígeno mediante MAbs o anticuerpos policlonales que recubran una fase sólida, normalmente sobre microplacas. Se necesitan cantidades de antígeno equivalentes a 10^4 – 10^5 DICT₅₀ de HVBo-1 para obtener resultados positivos fiables. Esta cantidad podría no ser excesivamente alta, dado que el ganado bovino puede excretar títulos de 10^8 – 10^9 DICT₅₀/ml de líquido nasal 3 a 5 días después de la infección con el HVBo-1. La sensibilidad puede aumentar mediante sistemas de amplificación (véase Edwards & Gitao, 1987).

Contrariamente a lo que ocurre en el aislamiento vírico, no se necesitan instalaciones de cultivo celular para las técnicas de detección directa del antígeno y puede llevarse a cabo un diagnóstico de laboratorio en un día. Los inconvenientes son la menor sensibilidad de la detección directa de antígeno y el requisito adicional de llevar a cabo otro aislamiento vírico, en el caso de que se necesite la cepa para otros estudios.

Por lo tanto, la PCR en tiempo real es el método de referencia, y la detección de antígeno solo debe utilizarse si no se dispone de ningún otro medio.

1.5. Diferenciación entre subtipos de herpesvirus bovino tipo 1 y subtipos de alfaherpesvirus de rumiantes relacionados con el herpesvirus bovino tipo 1

Mediante los adecuados MAbs para pruebas de inmunofluorescencia, radioinmunoprecipitación, inmunoperoxidasa o inmunotransferencia, pueden diferenciarse los subtipos 1 de los subtipos 2b del HVBo-1 (Rijsewijk *et al.*, 1999; Wyler *et al.*, 1989). La digestión de ADN vírico mediante endonucleasa de restricción permite diferenciar los subtipos del HVBo-1. El análisis RFLP incluye la extracción de ADN de viriones o de células infectadas, la digestión del ADN aislado mediante endonucleasas de restricción, y la separación de los fragmentos resultantes mediante electroforesis en gel de agarosa. La diferenciación de los subtipos 1, 2a y 2b del HVBo-1 mediante digestión con endonucleasa HindIII se basa en el peso molecular de cada uno de los tres fragmentos de ADN relevantes (*I*, *K* y *L*) (Metzler *et al.*, 1985). Las técnicas de RFLP tienen poco valor diagnóstico, pero podrían ser útiles en estudios epidemiológicos. Además, puede compararse el patrón RFLP de cepas víricas con el de cepas de vacuna viva.

Cuando se precisa diferenciar entre alfaherpesvirus relacionados antigénica y genéticamente (HVBo-1, HVBo-5, herpesvirus caprino 1, herpesvirus de los cérvidos 1 y 2, herpesvirus del alce 1, herpesvirus de los búfalos 1), puede utilizarse métodos mejorados en los que se usan anticuerpos monoclonales (Keuser *et al.*, 2004) o bien amplificación mediante PCR y posterior secuenciación del producto obtenido (Ros *et al.*, 1999).

También se pueden utilizar técnicas de HTS para conocer el genoma completo del HVBo-1 y comparar entre las cepas de los brotes. Es probable que la HTS se utilice con más frecuencia debido a la mejora de la tecnología y de los protocolos aplicables. Para optimizar los resultados, el título vírico debe ser lo más alto posible, y debe tenerse en cuenta que las preparaciones víricas purificadas permiten mejorar los resultados de la secuenciación. Véase también el Capítulo 1.1.7 *Normas para la secuenciación de alto rendimiento, bioinformática y genómica computacional*.

1.6. Interpretación de resultados

El aislamiento de HVBo-1 de un animal enfermo no significa necesariamente que el virus sea la causa de la enfermedad. Podría, por ejemplo, ser un virus latente que se ha reactivado debido a condiciones estresantes. Debe llevarse a cabo un diagnóstico de laboratorio confirmativo analizando un grupo de animales, que deberá ir acompañado de una seroconversión de negativo a positivo, o de un aumento

de cuatro veces o más en los títulos de anticuerpos específicos del HVBo-1. Mediante una prueba serológica se comprueba si en muestras de suero pareadas recogidas con 3–4 semanas hay anticuerpos específicos (véase el apartado B.2).

2. Pruebas serológicas

Pueden utilizarse pruebas serológicas con varios fines:

- i) Diagnosticar una infección aguda: en una prueba se analizan muestras de suero pareadas de las fases aguda y convaleciente de infección de los mismos animales. Una seroconversión de negativo a positivo o un aumento de cuatro veces o más en los títulos de anticuerpos se considera una prueba de infección aguda.
- ii) Demostrar la ausencia de infección, por ejemplo a efectos del comercio internacional.
- iii) Determinar la prevalencia de infección en estudios sero-epidemiológicos.
- iv) Respalidar programas de erradicación y la posterior vigilancia.
- v) Para la investigación, por ejemplo la evaluación de la respuesta inmunitaria tras la vacunación y la exposición al agente patógeno.

Para detectar anticuerpos contra el HVBo-1 en el suero suelen utilizarse pruebas de neutralización vírica (VN) (Bitsch, 1978) y distintos ELISA (Kramps *et al.*, 1993). Dado que la latencia vírica es una secuela normal de la infección por el HVBo-1, la identificación de animales serológicamente positivos proporciona un indicador útil y fiable del estado respecto a la infección. Todo animal con anticuerpos contra el virus se considera un portador y un posible excretor intermitente del virus. Las únicas excepciones son los terneros que han adquirido pasivamente anticuerpos del calostro de su madre, y ganado bovino no infectado vacunado con vacunas inactivadas. Se ha comprobado que, en condiciones experimentales, los terneros infectados bajo la protección de la inmunidad materna puedan volverse serológicamente negativos aun siendo portadores de una infección latente reactivable (Lemaire *et al.*, 2000).

En general, las pruebas serológicas para la detección del HVBo-1 pueden clasificarse en convencionales o marcadoras. Hasta ahora, las únicas pruebas serológicas marcadoras de las que se dispone son los ELISA de bloqueo para la detección de anticuerpos contra la gE del HVBo-1 (gE-ELISA) (Van Oirschot *et al.*, 1997). Los animales vacunados con vacunas marcadoras preparadas con virus en el que se ha suprimido el gen de la gE pueden diferenciarse de los animales infectados por el virus natural mediante una reacción serológica negativa a la gE. Para la serología convencional, puede utilizarse VN, ELISA de bloqueo para la detección de anticuerpos anti HVBo-1 o ELISA indirecto.

Para la detección de anticuerpos en muestras de leche de tanque, los métodos ELISA, incluyendo el gE-ELISA, son los más utilizados (Wellenberg *et al.*, 1998a), pero presentan algunas limitaciones. En las pruebas que se llevan a cabo con leche de tanque, un resultado positivo en una prueba específica para la gB indica que varios animales del rebaño están infectados (Frankena *et al.*, 1997). Con un ELISA-gE, la leche de tanque solo da una reacción positiva cuando está infectado más del 10–15% del rebaño (Wellenberg *et al.*, 1998b), aunque la sensibilidad puede aumentarse mediante protocolos de concentración de la leche (Schroeder *et al.*, 2012). Por consiguiente, no es posible declarar que un rebaño esté libre de la infección por HVBo-1 basándose en pruebas realizadas con muestras de leche de tanque o compuestas, y un ELISA-gE o gB negativo realizado con leche de tanque debe ir seguido de un análisis de muestras de sangre individuales de todos los animales del rebaño. Sin embargo, los ELISA indirectos optimizados para la utilización con muestras de leche de tanque de hasta 50 vacas (o hasta 100 animales en las regiones libres de HVBo-1) pueden indicar de forma fiable el estado de estos animales respecto al HVBo-1. Estos sistemas analíticos permiten detectar una muestra débilmente positiva en una muestra combinada formada por 50 muestras de leche o una muestra fuertemente positiva en una muestra combinada formada por 100 muestras de leche. A efectos de una vigilancia general, las pruebas realizadas en leche de tanque pueden dar una estimación de la prevalencia del HVBo-1 tanto un rebaño como en una zona o en un país (Nylin *et al.*, 2000). Estas pruebas deben complementarse con análisis del suero (con muestras individuales o compuestas) de rebaños que no se estén ordeñando. Para realizar un seguimiento del estado de rebaños lecheros respecto al HVBo-1, deben analizarse muestras de leche de tanque de hasta 50 (o hasta 100 en las regiones libres de HVBo-1) animales 3 a 4 veces al año con un ELISA indirecto adecuado. En rebaños de más de 50 vacas (o hasta 100 en las regiones libres de HVBo-1), deben analizarse varios tanques de leche que contengan leche de los animales. Los resultados de leche de tanque positivos deben confirmarse mediante el análisis de muestras de sangre o leche individuales de todos los animales de los que se haya extraído leche para formar la muestra de leche de tanque que ha dado positivo.

En un estudio extensivo se evaluaron pruebas para la detección de anticuerpos según se utilizaron en laboratorios nacionales de referencia de Europa (Kramps *et al.*, 2004). En este estudio participaron doce laboratorios de referencia de 12 países europeos. Procedentes de varios países se enviaron 53 muestras de suero y 13 muestras de leche, por duplicado y codificadas, a los laboratorios participantes. Las muestras de

siero incluyeron los tres sueros de referencia europeos EU1 (positivo a anticuerpos), EU2 (débilmente positivo a anticuerpos y definido como muestra dudosa) y EU3 (negativo a anticuerpos) (Perrin *et al.*, 1994). En aquel momento, se llegó a la conclusión de que la VN y los ELISA-gB son las pruebas más sensibles para la detección de anticuerpos en el suero. No obstante, los sistemas de ELISA actuales ofrecen una sensibilidad claramente mejorada. Debido a la muy alta sensibilidad de los ELISA de bloqueo para la gB, unos resultados débilmente positivos a anticuerpos anti-gB a menudo no pueden confirmarse mediante sistemas analíticos alternativos (ELISA indirecto, VN). Recientemente se han desarrollado nuevos ELISA indirectos para el HVBo-1 que también son muy sensibles y específicos. Los resultados de estos ELISA son comparables a los obtenidos al utilizar ELISA de bloqueo para la gB (Beer *et al.*, 2003).

Los ELISA-gE son menos sensibles y específicos que los sistemas analíticos convencionales. Además, la seroconversión contra la gE puede retrasarse, sobre todo en animales vacunados, y a menudo no es detectable antes del día 21 a 35 post-infección. Actualmente existen como mínimo tres sistemas comerciales de ELISA-gE distintos, lo cual permite el análisis de muestras con ELISA-gE de distintas características.

2.1. Neutralización vírica

Las pruebas de VN se llevan a cabo con distintas modificaciones. Las pruebas varían respecto a la cepa vírica utilizada en el protocolo analítico, a la dilución inicial del suero, al periodo de incubación del virus/suero (1-24 horas), al tipo de células utilizadas, al día de la lectura final y a la lectura del punto final (50% frente a 100%) (Perrin *et al.*, 1993). Entre estas variables, el periodo de incubación del virus/suero tiene el efecto más destacado en la sensibilidad de la VN. Un periodo de incubación de 24 horas puede dar títulos de anticuerpos hasta 16 veces más altos que un periodo de incubación de 1 hora (Bitsch, 1978), y se recomienda cuando se requiere la sensibilidad máxima (por ejemplo, a efectos del comercio internacional). Distintas células o líneas celulares bovinas son adecuadas para la prueba de la VN, incluidas células de riñón o testículo bovino secundarias, cepas celulares de pulmón o tráquea bovina, o la línea celular establecida de riñón bovino Madin-Darby (MDBK).

2.1.1. Protocolo adecuado para una prueba de VN

- i) Se inactivan sueros, incluidos sueros estándar control, durante 30 minutos en un baño de agua a 56°C.
- ii) Se realizan diluciones a la mitad de sueros problema en medio de cultivo celular. Se empieza con suero no diluido y se continúa horizontalmente hasta la dilución 1/1024 en una placa de microtitulación de grado de cultivo celular, con 96 pocillos de fondo plano. Se utilizan por lo menos tres pocillos por dilución y 50 µl por pocillo. En la prueba también se incluyen diluciones de un suero control positivo, de uno débilmente positivo y de un control interno negativo. Se utiliza un pocillo adicional con suero sin diluir como control de la toxicidad de los sueros
- iii) Se añaden 50 µl por pocillo del stock del HVBo-1 diluido en un medio de cultivo de modo que suponga 100–200 DICT₅₀ por pocillo. En los pocillos de control de la toxicidad, se añaden 50 µl del medio de cultivo en lugar de virus. Se añaden 100 µl del medio de cultivo a diez pocillos vacíos para los controles celulares.
- iv) Se hacen por lo menos cuatro diluciones decimales del stock residual de virus (titulación por retroceso) en medio de cultivo, utilizando 50 µl por pocillo y al menos cuatro pocillos por cada dilución
- v) Se incuban las placas 24 horas a 37°C.
- vi) Se añaden 100 µl de la suspensión celular por pocillo, a razón de 3×10^4 células por pocillo.
- vii) Se incuban las placas 3–5 días a 37°C.
- viii) Se comprueba al microscopio si las placas presentan ECP. Se valida la prueba comprobando la titulación por retroceso del virus (que debería dar un valor de 100 DICT₅₀, con una variación permisible de 30–300 DICT₅₀), los sueros control y los pocillos control de células. El suero control positivo debería dar un título de ± 1 dilución a la mitad ($\pm 0,3$ unidades logarítmicas decimales) respecto a su valor objetivo. El suero débilmente positivo debería ser positivo. El suero negativo no debería producir la neutralización (equivalente a una dilución final de 1/2 en la fase de neutralización). En los pocillos de control de células, la monocapa debería estar intacta
- ix) Los resultados del suero problema se expresan como el inverso de la dilución del suero que neutraliza el virus en el 50% de los pocillos. Si en el 50% de los pocillos con suero no diluido se neutralizó el virus, el título (de la dilución inicial) se considera 1 (1/2 utilizando la

dilución final convencional). Si todos los pocillos con suero no diluido y el 50% de los pocillos con suero diluido a 1/2 mostraran neutralización del virus, el título (de la dilución inicial) sería 2 (dilución final 1/4). Para resultados cualitativos, cualquier neutralización de título 1 o superior (dilución inicial convencional) se considera positiva. Si se observa citotoxicidad en los pocillos control, la muestra se describe como tóxica (sin resultado), a menos que se observe una neutralización del virus sin citotoxicidad a diluciones más altas y se pueda establecer un título sin ambigüedad. Cuando la citotoxicidad de un suero interfiere con la interpretación de la actividad neutralizante de la muestra, un cambio del medio en los pocillos de las dos o tres diluciones inferiores 16 a 24 horas después de añadir células podría eliminar los efectos citotóxicos.

2.2. Enzoinmunoanálisis

Los métodos de ELISA para detectar anticuerpos contra el HVBo-1 se utilizan mucho, pero no se ha establecido un procedimiento ELISA estándar. Hay disponibles en el mercado varios tipos de ELISA, incluidos ELISA indirectos y de bloqueo, algunos de los cuales también son adecuados para detectar anticuerpos en leche (Kramps *et al.*, 2004). Por razones de estandarización en un país o estado, podría ser deseable comparar la calidad de los kits y realizar pruebas de lotes para su comercialización respecto a criterios definidos previamente en un laboratorio nacional de referencia, antes de su uso en otros laboratorios del país.

Existen ciertas variaciones en los procedimientos para el ELISA. Los más comunes son: las preparaciones y los recubrimientos de antígeno, la dilución de la muestra de ensayo, el período de incubación del antígeno y la muestra problema, y la solución de sustrato/cromógeno. Antes de su uso rutinario, debe comprobarse la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad del ELISA (véase el Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*). Con este fin, se debe analizar un juego de sueros bien definidos (por ejemplo, mediante la prueba de VN), fuertemente positivos y negativos. Sin embargo, se recomienda utilizar ELISA comerciales que se haya comprobado que tengan mejor rendimiento que las pruebas internas (Kramps *et al.*, 2004).

2.2.1. Enzoinmunoanálisis indirecto

El principio de un ELISA indirecto se basa en la unión de anticuerpos específicos anti-HVBo-1 presentes en la muestra problema a antígeno HVBo-1 inmovilizado. Los anticuerpos unidos se detectan utilizando antisuero anti-inmunoglobulina bovina marcado con enzima. La presencia de anticuerpos en la muestra problema dará lugar a color tras añadir la solución de sustrato/cromógeno. Este principio analítico es el más adecuado para las muestras de leche individuales y combinadas.

2.2.2. Enzoinmunoanálisis de bloqueo

El principio del ELISA de bloqueo o competitivo se basa en bloquear la unión de un antisuero anti HVBo-1 o de un MAb anti-HVBo-1 marcados con enzima al antígeno, mediante anticuerpos de la muestra problema. La presencia de anticuerpos en la muestra problema da lugar a una escasa aparición de color tras añadir la solución de sustrato/cromógeno. A continuación se indica un ejemplo de procedimiento de ELISA de bloqueo para la gB.

- i) Se prepara el antígeno haciendo crecer el HVBo-1 en cultivos celulares. Cuando se observa un extenso ECP, se congelan el medio y las células a -20°C . Después de descongelar, el lisado celular resultante se centrifuga durante 4 horas a 8.500 *g*. El precipitado que contiene el virus se resuspende en un pequeño volumen de solución salina tamponada con fosfato (PBS), se enfría con hielo, y se desintegra con ultrasonidos. Después se centrifuga la preparación de antígeno durante 10 minutos a 800 *g* y, se inactiva añadiendo detergente (concentración final de 0,5 % de Nonidet P 40). La preparación de antígeno se utiliza a una dilución apropiada para recubrir las placas de microtitulación. En la literatura publicada sobre el tema se pueden encontrar muchos métodos alternativos para la producción de antígeno
- ii) Se recubren con antígeno las placas de microtitulación añadiendo 100 μl de antígeno diluido (en 0,05 M de tampón carbonato, pH 9,6) a cada pocillo de la microplaca. Se sellan las placas con cinta adhesiva, se incuban a 37°C toda la noche y se guardan a -20°C
- iii) Antes de realizar la prueba, se lavan las placas con 0,05% de Tween 80. Se añaden 100 μl de suero negativo (suero fetal bovino, FCS), 100 μl de cada una de las muestras problema y 100 μl de sueros control positivo, débilmente positivo, y negativo. Normalmente, las muestras de suero se analizan sin diluir. Las placas se agitan, se sellan

y se incuban toda la noche a 37°C. Si se sospecha de falsos positivos (por ejemplo, cuando se obtienen resultados epidemiológicamente no plausibles), se recomienda volver a analizar los sueros calentándolos durante 30 minutos a 56°C tras un ciclo de congelación-descongelación.

- iv) Se lavan las placas cuidadosamente y se añaden 100 µl de anticuerpo monoclonal contra la gB del HVBo-1, conjugado con peroxidasa de rábano a una dilución predeterminada y se incuban de nuevo durante 1 hora a 37°C. Debe seleccionarse cuidadosamente el anticuerpo monoclonal respecto a su especificidad para la gB del HVBo-1.
- v) Se lavan las placas y se añade una solución recién preparada de sustrato/cromógeno (por ejemplo, tampón de ácido cítrico 0,05 M, pH 4,5, que contenga 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolina]-6 ácido sulfónico [ABTS; 0,55 mg/ml] y una solución al 3% de H₂O₂ recién añadido [5 µl/ml], y se incuban durante el tiempo adecuado (1-2 horas a temperatura ambiente)
- vi) Se mide la absorbancia de las placas en un fotómetro de microcapas a 405 nm
- vii) Se calcula el porcentaje de bloqueo para cada muestra problema $[(OD_{FCS} - OD_{muestra \text{ de prueba}}) / OD_{FCS} \times 100\%]$
- viii) Una muestra problema se considera positiva si el valor de la absorbancia es, por ejemplo, del 50% o superior. La prueba es válida si los sueros control positivo y débilmente positivo son positivos y si el suero control negativo es negativo. Los límites de aceptación para los valores control y de corte deben determinarse para cada prueba.

2.3. Estandarización

En cada prueba serológica se deben incluir controles adecuados de suero fuertemente positivo, de suero débilmente positivo, y de suero negativo. En Europa, un grupo de científicos encabezado por el grupo de veterinarios de inseminación artificial de la Unión Europea (EU) ha acordado utilizar un suero fuertemente positivo (EU1), uno débilmente positivo (EU2) y otro negativo (EU3) para la estandarización de las pruebas sobre el HVBo-1 en los laboratorios que examinan rutinariamente muestras de los centros de inseminación artificial (Perrin *et al.*, 1994). Estos sueros se han adoptado como estándares internacionales de la OIE para pruebas con el HVBo-1 y están disponibles en cantidades limitadas en los Laboratorios de Referencia de la OIE para RBI/VPI⁵. Las pruebas que son adecuadas para certificar animales individuales antes de los desplazamientos (VN o ELISA) deben ser capaces de registrar como positivos tanto los estándares fuertemente positivos como los débilmente positivos (o los estándares nacionales secundarios de potencia equivalente). Debido a la escasa disponibilidad de los sueros estándar internacionales, es preciso preparar un nuevo y amplio panel de muestras de suero liofilizado de referencia (y de leche) tomadas de animales infectados y de animales vacunados. Este panel debe utilizarse para validar las nuevas pruebas que se vayan elaborando y para armonizar las pruebas entre los distintos laboratorios. Existen otros sueros de referencia en pequeñas cantidades en los Laboratorios de Referencia de la OIE (como los sueros estándar R1, el R2 y el R2 como positivo, débilmente positivo y muy débilmente positivo del Laboratorio de Referencia de la OIE de Alemania).

2.4. Reactividad inespecífica en la serología para la detección del HVBo-1 y al utilizar 'pseudovacunas'

La reactividad inespecífica de sueros en los ELISA para la detección del HVBo-1 debe tenerse en cuenta, y se observa con mayor frecuencia en la prueba marcadora que en la serología convencional. Existen varios motivos por los que pueden aparecer reacciones inespecíficas:

- i) que existan variaciones entre lotes del ELISA utilizado;
- ii) que las muestras se analicen muy rápido tras ser recogidas (fenómeno de frescura);
- iii) que las muestras se analicen mediante un ELISA-gE en un plazo de 4 semanas tras la vacunación con una vacuna marcadora (fenómeno de la vacunación);
- iv) que la muestra tenga mala calidad (por ejemplo, muestras que presenten hemólisis).

Por tanto, deben tenerse en cuenta las siguientes medidas:

5 FLI, Greifswald-Insel Riems, Alemania y APHA, Weybridge, Reino Unido.

- i) debe implementarse una validación de cada lote de prueba analítica, y deben analizarse las pruebas en el momento de comercializar los lotes;
- ii) las muestras deben guardarse a 4°C y no deben analizarse antes de las 24–48 horas tras la recogida;
- iii) las muestras deben someterse a un ciclo de congelación-descongelación (–20°C); en algunos casos, una posterior inactivación térmica (30 minutos/56°C) puede eliminar reacciones inespecíficas en las muestras de suero;
- iv) en el ganado bovino no deben realizarse pruebas serológicas para detectar el HVBo-1 antes de que pasen 4 semanas tras cualquier vacunación;
- v) no debe utilizarse gE-ELISA para clasificar animales no vacunados.

En regiones libres de RIB/VPI, en ocasiones se detectan reacciones no plausibles en algunos animales al utilizar ELISA-gB indirecto y de bloqueo, lo cual causa problemas en cuanto a la determinación del estatus tanto del animal como del rebaño en cuestión. Se ha sugerido que una infección por el HVBo-2 podría ser la causa de esta reactividad cruzada (Böttcher *et al.*, 2012). Es importante destacar que los ELISA-gE son las pruebas serológicas más específicas para detectar el HVBo-1 y que en estos ELISA se observa una reactividad cruzada muy baja con herpesvirus distintos del HVBo-1. Esto es especialmente importante en regiones libres de HVBo-1 en las que se detecta reacción cruzada en animales aislados, y podría malinterpretarse como una incursión del HVBo-1 en el rebaño. Por lo tanto, en las regiones libres, debe utilizarse ELISA-gE y VN para verificar estos resultados aislados. Se recomienda repetir el análisis de estos animales pasados 28 días con un ELISA-gE empleando un umbral más bajo (por ejemplo, de 0,95) para aumentar así la sensibilidad. En el caso de obtener dos resultados negativos con ELISA-gE, el animal no se clasificará como positivo para HVBo-1, pero se recomienda sacrificarlo porque pueden tener lugar problemas de diagnóstico con otros sistemas de análisis (por ejemplo, resultados positivos en las muestras de leche del rebaño afectado).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

Actualmente se dispone de varias vacunas contra el HVBo-1 tanto atenuadas como inactivadas. Las cepas vacunales suelen haber sido sometidas a múltiples pases en cultivo celular. Algunas de las cepas víricas de las vacunas tienen un fenotipo termosensible, es decir, no se replican a temperaturas de 39°C o superiores. Las vacunas atenuadas se administran por vía intranasal o intramuscular. En cuanto a las inactivadas, contienen altas concentraciones de virus inactivado o partes de la partícula vírica (glicoproteínas) suplementadas con un adyuvante para estimular una suficiente respuesta inmunitaria. Las vacunas inactivadas se administran por vía intramuscular o subcutánea. La vacunación contra el HVBo-1 se utiliza para proteger animales de la evolución clínica de la infección, y como ayuda en los programas de control y erradicación.

Ahora se dispone de vacunas marcadoras o DIVA (diferenciación entre animales infectados y vacunados) e distintos países. Estas vacunas marcadoras, atenuadas o inactivadas, se basan en mutaciones de supresión (supresión del gen de la gE) o en una subunidad del virión, por ejemplo la glicoproteína D. LA utilización de estas vacunas marcadoras junto con pruebas diagnósticas acompañantes permite diferenciar entre ganado bovino infectado y vacunado (principio DIVA), y proporciona la base para los programas de erradicación del HVBo-1 en países o zonas con una alta prevalencia de animales infectados por el virus natural. Los programas de vacunación intensiva pueden reducir la prevalencia de animales infectados (Bosch *et al.*, 1998; Mars *et al.*, 2001), de la cual podría realizarse un seguimiento utilizando una prueba diagnóstica adecuada. en situaciones en las que es económicamente justificable, los animales infectados residuales podrían sacrificarse, y se obtendría así una zona libre del HVBo-1. A principios de los años 1980 se inició en algunos países un control y erradicación del HVBo-1. Se han utilizado distintas políticas debido a diferencias en la prevalencia en el ganado, prácticas de cría y estrategias de erradicación de la enfermedad. Hasta ahora, en la Unión Europea solo se han comercializado y utilizado en programas de control o erradicación vacunas DIVA con supresión del gen de la gE (tanto vivas como muertas).

En el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias* se indican las directrices para la producción de vacunas veterinarias. Las directrices indicadas aquí y en el Capítulo 1.1.8 son de carácter general y podrían tener que complementarse con requisitos nacionales y regionales.

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

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

La vacuna se prepara utilizando un sistema similar al de lotes de siembra. Deben registrarse el origen, el historial de pases y las condiciones de almacenaje del virus de inóculo primario (MSV). Debe llevarse a cabo una prueba de identidad del virus en el MSV. El lote de siembra con cepas del HVBo-1 tiene que ser atenuado para obtener una cepa vacunal viva. Las cepas pueden atenuarse mediante múltiples pases en cultivos celulares, adaptando el virus a crecer a bajas temperaturas (mutantes termosensibles) o mediante ingeniería genética, por ejemplo, suprimiendo uno o más genes del virus (por ejemplo, el gen de la glicoproteína E del HVBo-1) que no sean esenciales para la replicación. Debe haber algún modo de diferenciar el virus vacunal vivo de los virus naturales (por ejemplo, mediante patrones de crecimiento específicos de la temperatura o mediante polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción). Las cepas que se utilicen para la preparación de vacunas inactivadas no precisan atenuación. El lote de siembra debe estar libre de contaminantes.

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

Se comprueba si el lote de siembra contiene virus extraños o contaminación bacteriana, fúngica o por micoplasmas. En las vacunas contra el HVBo-1 debe excluirse específicamente los siguientes virus extraños: adenovirus, virus Akabane, virus Schmallenberg, coronavirus bovino, herpesvirus bovino tipos 2, 4 y 5, parvovirus bovino, virus respiratorio sincitial bovino, virus de la diarrea vírica bovina y pestivirus atípicos, rotavirus bovino, virus de la vaccinia y los virus de la enfermedad de Aujeszky, de la lengua azul, de la fiebre efímera bovina, de la leucemia bovina, del papiloma bovino, de la estomatitis papular bovina, de la viruela bovina, de la glosopeda, de la dermatosis nodular, de la fiebre catarral maligna, de la parainfluenza 3, de la rabia, de la peste bovina y de la estomatitis vesicular. Dado que el virus de la diarrea vírica bovina (tanto con ECP como sin ECP) se ha hallado con gran frecuencia como contaminante de vacunas, debe prestarse especial atención a la ausencia del VDVB. Además, deben tenerse en cuenta otros pestivirus atípicos (por ejemplo, HoBi o tipo HoBi) como posibles contaminantes.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

Las células que se utilizan para la producción de vacuna se preparan utilizando un sistema de lote de células primarias. El virus debe cultivarse en líneas celulares establecidas que se sepa que son adecuadas para la producción de vacuna, como la línea celular de riñón bovino Madin-Darby (MDBK). Debe conocerse el historial de la línea celular. La línea celular debe estar libre de agentes extraños y tal vez tenga que comprobarse su tumorigenicidad.

2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

Todos los sustratos utilizados para la fabricación de vacunas deben estar libres de contaminantes. Deben utilizarse células que no hayan sido sometidas a más de 20 pases desde la reserva celular primaria. El virus inóculo no debe haber sido sometido a más de 5 pases desde el MSV. Las cepas vacunales manipuladas mediante ingeniería genética se tratan del mismo modo que las cepas víricas vacunales atenuadas convencionalmente. Cuando se cultivan suficientes células, tiene lugar una infección de la línea celular con el virus vacunal. La adición de antibióticos suele limitarse a los líquidos del cultivo celular. El líquido sobrenadante se recoge en los momentos en que tienen lugar los picos de producción de virus (antígeno). En el caso de las vacunas vivas, se clarifica el sobrenadante, se mezcla con un estabilizador, se liofiliza y se embotella. En el caso de la producción de las vacunas clásicas inactivadas, el sobrenadante se homogeneiza antes de añadir el agente inactivante, con el fin de garantizar una adecuada inactivación. Tras el procedimiento de inactivación, se lleva a cabo una prueba para garantizar la inactivación completa del virus. La prueba debe incluir al menos dos pases en células. a continuación, se mezcla la suspensión vírica inactivada con un adyuvante, y se embotella. La fabricación de vacunas debe cumplir las directrices de Buenas

Prácticas de Fabricación (BPF) y reglamentación local como la Farmacopea Europea o el Código Federal de Regulaciones de EE.UU. (9CFR).

2.2.3. Controles durante el proceso

Debe comprobarse que el inóculo celular de trabajo y el inóculo vírico de trabajo están libres de contaminantes. Las células deben presentar una morfología que no llame la atención para ser inoculadas con el virus. Durante el cultivo se comprueba si aparece ECP. Las células control no inoculadas deben mantener su morfología hasta el momento de la recogida. Se lleva a cabo una titulación del virus en el sobrenadante recogido. Durante la producción de vacunas inactivadas, se llevan a cabo pruebas para garantizar la inactivación. Debe comprobarse si la vacuna a granel final contiene contaminantes.

2.2.4. Pruebas en lotes del producto final

Normalmente en todos los lotes deben realizarse las siguientes pruebas. En las directivas de la UE, en la Farmacopea Europea y en el 9CFR pueden hallarse ejemplos de directrices para realizar el control de los lotes.

i) Esterilidad/pureza

No puede haber bacterias, hongos, micoplasmas ni virus extraños. En el Capítulo 1.1.9 pueden hallarse las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario.

ii) Inocuidad

En el caso de las vacunas inactivadas, una dosis doble de vacuna, y en el caso de las vacunas vivas, una dosis de vacuna diez veces superior a la recomendada no deben producir efectos adversos en terneros de corta edad seronegativos al HVBo-1.

iii) Potencia del lote

Es suficiente comprobar la eficacia en un lote representativo, como se describe en el apartado C.2.3.2. En el caso de las vacunas vivas, debe determinarse el título vírico de cada lote y no debe ser superior a 1/10 de la dosis a la cual se ha comprobado que la vacuna es segura, y no inferior al título mínimo de comercialización. En el caso de las vacunas inactivadas, la potencia se comprueba utilizando otro método validado, como por ejemplo, la evaluación de la eficacia en terneros.

2.3. Requisitos para la autorización

2.3.1. Requisitos de inocuidad

i) Inocuidad en especies de destino y en especies no de destino

Una cantidad de virus equivalente a diez dosis de la vacuna: (a) no debe inducir reacciones locales ni sistémicas significativas en terneros de corta edad; (b) no debe causar infección fetal ni aborto, y (c) no debe revertir a la virulencia durante cinco pases seriados en terneros. En el caso de las vacunas inactivadas, normalmente se administra una dosis doble. La prueba de la reversión a la virulencia no es aplicable a las vacunas inactivadas.

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas

La cepa vacunal final escogida no debe revertir a la virulencia durante un mínimo de cinco pases seriados en terneros.

iii) Consideraciones medioambientales

Las cepas vacunales atenuadas no debe ser capaces de perpetuarse autónomamente en una población bovina ($R_0 < 1$).

2.3.2. Requisitos de eficacia

i) Para la ganadería

Deben demostrarse en pruebas de exposición a la vacunación en condiciones de laboratorio. En una monografía de la Farmacopea Europea (Tercera Edición (1997)) se ofrece un ejemplo de las directrices a seguir. En pocas palabras, la vacuna se administra

a diez terneros de 2–3 meses de edad seronegativos al HVBo-1. Dos terneros se mantienen como controles. Todos los terneros se exponen por vía intranasal 3 semanas después a una cepa virulenta del HVBo-1 que da lugar a signos clínicos típicos de la infección por el HVBo-1. Los terneros vacunados no deben presentar signos clínicos, o bien solamente signos muy leves. El título vírico máximo (pico) en el mucus nasal de terneros vacunados debe ser un mínimo de 100 veces menor que el de los terneros control. El periodo de excreción del virus debe ser un mínimo de 3 años más corto en los terneros vacunados que en los terneros control.

Una vacuna eficaz contra el HVBo-1 debe inducir inmunidad protectora durante al menos 1 año, aunque en muchas vacunas no se ha comprobado que lo cumplan.

ii) Para el control y la erradicación

Además de los criterios anteriormente mencionados, las vacunas contra el HVBo-1 para el control y la erradicación de la enfermedad deben ser vacunas marcadoras (como las vacunas con supresión del gen de la gE), que permitan diferenciar entre animales infectados y vacunados (estrategia DIVA). Existen a la venta varias vacunas con supresión del gen de la gE (preparaciones inactivadas o vacunas vivas modificadas).

2.3.3. Estabilidad

En el caso de las vacunas vivas, deben determinarse los títulos víricos 3 meses después de la fecha de caducidad indicada. Además, también se llevan a cabo pruebas para determinar el contenido en humedad, las concentraciones de conservantes y el pH. En el caso de las vacunas inactivadas, también se comprueban la viscosidad y la estabilidad de la emulsión.

Debe comprobarse la eficacia de los conservantes. Debe comprobarse la concentración del conservante y su persistencia a lo largo de todo el periodo de validez. La concentración debe situarse dentro de los límites establecidos para el conservante.

3. Vacunas basadas en la ingeniería genética

3.1. Vacunas existentes y sus ventajas

Existe una vacuna inactivada con supresión del gen de la glicoproteína E (gE) que está basada en una cepa recombinante. Esta vacuna es comparable a otras vacunas con supresión del gen de la gE y está autorizada por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) para ser utilizada en la Unión Europea.

Se han descrito otras vacunas recombinantes, como subunidades de la gE o mutantes del HVBo-1 con supresión conseguida mediante ingeniería genética (por ejemplo, con supresiones de los genes de la gE y/o la gG), y se dispone de ellas en forma de prototipos.

Las ventajas de las vacunas contra el HVBo-1 basadas en la ingeniería genética podrían ser la posibilidad de características marcadoras adicionales para la diferenciación de animales infectados y vacunados (DIVA; por ejemplo, ELISA para la detección de anticuerpos anti-gB para las vacunas de subunidades gD o ELISA para la detección de anticuerpos anti-gG para las respectivas mutaciones de supresión).

3.2. Requisitos especiales para las vacunas basadas en la ingeniería genética, si las hay

Las vacunas recombinantes que vayan destinadas a ser utilizadas en la Unión Europea deben ser autorizadas por la EMA.

BIBLIOGRAFÍA

ABRIL C., ENGELS M., LIMAN A., HILBE M., ALBINI S., FRANCHINI M., SUTER M. & ACKERMANN M. (2004). Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. *J. Virol.*, **78**, 3644–3653.

ASHBAUGH S.E., THOMPSON K.E., BELKNAP E.B., SCHULTHEISS P.C., CHOWDHURY S. & COLLINS J.K. (1997). Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 387–394.

- BEER M., KÖNIG P., SCHIELKE G. & TRAPP S. (2003). Markerdiagnostik in der Bekämpfung des Bovinen Herpesvirus vom Typ 1: Möglichkeiten und Grenzen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, **116**, 183–191.
- BÖTTCHER J., BOJE J., JANOWETZ B., ALEX M., KÖNIG P., HAGG M., GÖTZ F., RENNER K., OTTERBEIN C., MAGES J., MEIER N. & WITTKOWSKI G. (2012). Epidemiologically non-feasible singleton reactors at the final stage of BoHV1 eradication: serological evidence of BoHV2 cross-reactivity. *Vet. Microbiol.*, **159**, 282–290. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.04.017. Epub 2012 Apr 20
- BITSCH V. (1978). The P37/24 modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus serum neutralization test. *Acta Vet. Scand.*, **19**, 497–505.
- BOSCH J.C., DE JONG M.C.M., FRANKEN P., FRANKENA K., HAGE J.J., KAASHOEK M.J., MARIS-VELDHUIS M.A., NOORDHUIZEN J.P.T.M., VAN DER POEL W.H.M., VERHOEFF J., WEERDMEESTER K., ZIMMER G.M. & VAN OIRSCHOT J.T. (1998). An inactivated gE-negative marker vaccine and an experimental gD-subunit vaccine reduce the incidence of bovine herpesvirus 1 infections in the field. *Vaccine*, **16**, 265–271.
- BRUNNER D., ENGELS M., SCHWYZER M. & WYLER R. (1988). A comparison of three techniques for detecting bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) in naturally and experimentally contaminated bovine semen. *Zuchthygiene (Berlin)*, **23**, 1–9.
- DEKA D., MAITI RAMNEEK N.K. & OBEROI M.S. (2005). Detection of bovine herpesvirus-1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24**, 1085–1094.
- EDWARDS S., CHASEY D. & WHITE H. (1983). Experimental infectious bovine rhinotracheitis: comparison of four antigen detection methods. *Res. Vet. Sci.*, **34**, 42–45.
- EDWARDS S. & GITAO G.C. (1987). Highly sensitive antigen detection procedures for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis: amplified ELISA and reverse passive haemagglutination. *Vet. Microbiol.*, **13**, 135–141.
- EDWARDS S., WHITE H. & NIXON P. (1990). A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 isolated in the U.K. *Vet. Microbiol.*, **22**, 213–223.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 3RD EDITION (1997). Monograph 0696: Live freeze dried vaccine for infectious bovine rhinotracheitis. Council of Europe, Strasbourg, France.
- FRANKENA K., FRANKEN P., VANDEHOEK J., KOSKAMP G. & KRAMPS J.A. (1997). Probability of detecting antibodies to bovine herpesvirus 1 in bulk milk after the introduction of a positive animal on to a negative farm. *Vet. Rec.*, **140**, 90–92.
- FUCHS M., HUBERT P., DETTERER J. & RZIHA H.-J. (1999). Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 2498–2507.
- GROM J., HOSTNIK P., TOPLAK I. & BARLIC-MAGANJA D. (2006). Molecular detection of BHV-1 in artificially inoculated semen and in the semen of a latently infected bull treated with dexamethasone. *Vet. J.*, **171**, 539–544.
- KAASHOEK M.J., MOERMAN A., MADIC J., RIJSEWIJK F.A.M., QUAK J., GIELKENS A.L.J. & VAN OIRSCHOT J.T. (1994). A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. *Vaccine*, **12**, 439–444.
- KEUSER V., SCHYNTS F., DETRY B., COLLARD A., ROBERT B., VANDERPLASSCHEN A., PASTORET P.-P. & THIRY E. (2004). Improved antigenic methods for differential diagnosis of bovine, caprine, and cervine alphaherpesviruses related to bovineherpesvirus 1. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 1228–1235.
- KRAMPS J.A., BANKS M., BEER M., KERKHOF S., PERRIN M., WELLENBERG G.J. & VAN OIRSCHOT J.T. (2004). Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. *Vet Microbiol.*, **102**, 169–181.
- KRAMPS J.A., QUAK S., WEERDMEESTER K & VAN OIRSCHOT J.T. (1993). Comparative study on sixteen enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to bovine herpesvirus 1 in cattle. *Vet. Microbiol.*, **35**, 11–21.
- LEMAIRE M., WEYNANTS V., GODFROID J., SCHYNTS F., MEYER G., LETESSON J.J. & THIRY E. (2000). Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *J. Clin. Microbiol.*, **38** (5), 1885–1894.

- LOVATO L., INMAN M., HENDERSON G., DOSTER A. & JONES C. (2003). Infection of cattle with a bovine Herpesvirus 1 strain that contains a mutation in the latency-related gene leads to increased apoptosis in trigeminal ganglia during the transition from acute infection to latency. *J. Virol.*, **77**, 4848–4857.
- MAGYAR G., TANYI J., HORNYAK A. & BATHA A. (1993). Restriction endonuclease analysis of Hungarian bovine herpesvirus isolates from different clinical forms of IBR, IPV and encephalitis. *Acta Vet. Hung.*, **41**, 159–170.
- MARS M.H., DE JONG M.C.M., FRANKEN P. & VAN OIRSCHOT J.T. (2001). Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. *Vaccine*, **19**, 1924–1930.
- MASRI S.A., OLSON W., NGUYEN P.T., PRINS S. & DEREGT D. (1996). Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. *Can. J. Vet. Res.*, **60**, 100–107.
- MECHOR G.D., ROUSSEAU C.G., RADOSTITS O.M., BABIUK L.A. & PETRIE L. (1987). Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. *Can. J. Vet. Res.*, **51**, 452–459.
- METZLER A.E., MATILE H., GASSMANN U., ENGELS M. & WYLER R. (1985). European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch. Virol.*, **85**, 57–69.
- MOORE S., GUNN M. & WALLS D. (2000). A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. *Vet. Microbiol.*, **75**, 145–153.
- NYLIN B., STROGER U. & RONSHOLT L. (2000). A retrospective evaluation of a bovine herpesvirus-1 (BHV-1) antibody ELISA on bulk-tank milk samples for classification of the BHV-1 status of Danish dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, **47**, 91–105.
- PARSONSON I.M. & SNOWDON W.A. (1975). The effect of natural and artificial breeding using bulls infected with, or semen contaminated with, infectious bovine rhinotracheitis virus. *Aust. Vet. J.*, **51**, 365–369.
- PERRIN B., BITSCH V., CORDIOLI P., EDWARDS S., ELOIT M., GUERIN B., LENIHAN P., PERRIN M., RONSHOLT L., VAN OIRSCHOT J.T., VANOPDENBOSCH E., WELLEMANS G., WIZIGMANN G. & THIBIER M. (1993). A European comparative study of serological methods for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **12**, 969–984.
- PERRIN B., CALVO T., CORDIOLI P., COUDERT M., EDWARDS S., ELOIT M., GUERIN B., KRAMPS J.A., LENIHAN P., PASCHALERI E., PERRIN M., SCHON J., VAN OIRSCHOT J.T., VANOPDENBOSCH E., WELLEMANS G., WIZIGMANN G. & THIBIER M. (1994). Selection of European Union standard reference sera for use in the serological diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **13**, 947–960.
- RIJSEWIJK F.A., KAASHOEK M.J., LANGEVELD J.P., MELOEN R., JUDEK J., BIENKOWSKA-SZEWCZYK K., MARIS-VELDHUIS M.A. & VAN OIRSCHOT J.T. (1999). Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *J. Gen. Virol.*, **80**, 1477–1483.
- ROLA J., POLAK M. & ZMUDZINSKI J. (2003). Amplification of DNA of BHV 1 isolated from semen of naturally infected bulls. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, **47**, 71–75.
- ROS C., RIQUELME M.E., OHMAN FORSLUND K. & BELAK S. (1999). Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genome sequences. *J. Virol. Methods*, **83**, 55–65.
- SANTURDE G., SILVA N.D., VILLARES R., TABARES E., SOLANA A., BAUTISTA J.M., CASTRO J.M. & DA SILVA N. (1996). Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Vet. Microbiol.*, **49**, 81–92.
- SCHROEDER C., HORNER S., BÜRGER N., ENGEMANN C., BANGE U., KNOOP E.V. & GABERT J. (2012). Improving the sensitivity of the IBR-gE ELISA for testing IBR marker vaccinated cows from bulk milk. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, **125**, 290–296.
- SCHYNTS F., BARANOWSKI E., LEMAIRE M. & THIRY E. (1999). A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wildtype bovine herpesvirus type 1 strains. *Vet. Microbiol.*, **66**, 187–195.
- SMITS C.B., VAN MAANEN C., GLAS R.D., DE GEE A.L., DIJKSTRAB T., VAN OIRSCHOT J.T. & RIJSEWIJK F.A. (2000). Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. *J. Virol. Methods*, **85**, 65–73.
- TERPSTRA C. (1979). Diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis by direct immunofluorescence. *Vet. Q.*, **1**, 138–144.

- THIRY J., KEUSER V., MUYLKENS B., MEURENS F., GOGEV S., VANDERPLASSCHEN A. & THIRY E. (2006). Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet. Res.*, **37**, 169–190.
- VAN ENGELENBURG F.A., MAES R.K., VAN OIRSCHOT J.T. & RIJSEWIJK F.A. (1993). Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 3129–3135.
- VAN ENGELENBURG F.A.C., VAN SCHIE F.W., RIJSEWIJK F.A.M. & VAN OIRSCHOT J.T. (1995). Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 308–312.
- VAN OIRSCHOT J.T., KAASHOEK M.J., MARIS-VELDHUIS M.A., WEERDMEESTER K. & RIJSEWIJK F.A.M. (1997). An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. *J. Virol. Methods*, **67**, 23–34.
- VAN OIRSCHOT J.T., STRAVER P.J., VAN LIESHOUT J.A.H., QUAK J., WESTENBRINK F. & VAN EXSEL A.C.A. (1993). A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet. Rec.*, **132**, 32–35.
- VILCEK S., NETTLETON P.F., HERRING J.A. & HERRING A.J. (1994). Rapid detection of bovine herpesvirus 1 (BHV 1) using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, **42**, 53–64.
- WANG J., O'KEEFE J., ORR D., LOTH L., BANKS M., WAKELEY P., WEST D., CARD R., IBATA G., VAN MAANEN K., THOREN P., ISAKSSON M. & KERKHOF P. (2008). An international inter-laboratory ring trial to evaluate a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in extended bovine semen. *Vet. Microbiol.*, **126**, 11–19.
- WEIBLEN R., KREUTZ L., CANABOROO T.F., SCHUCH L.C. & REBELATTO M.C. (1992). Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis. *J. Vet. Diag. Invest.*, **4**, 341–343.
- WELLENBERG G.J., VERSTRATEN E.R.A.M., MARS M.H. & VAN OIRSCHOT J.T. (1998a). Detection of bovine herpesvirus 1 glycoprotein E antibodies in individual milk samples by enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 409–413.
- WELLENBERG G.J., VERSTRATEN E.R.A.M., MARS M.H. & VAN OIRSCHOT J.T. (1998b). ELISA detection of antibodies to glycoprotein E of bovine herpesvirus 1 in bulk milk samples. *Vet Rec.*, **142**, 219–220.
- WERNIKE K., HOFFMANN B., KALTHOFF D., KÖNIG P. & BEER M. (2011). Development and validation of a triplex real-time PCR assay for the rapid detection and differentiation of wild-type and glycoprotein E-deleted vaccine strains of Bovine herpesvirus type 1. *J. Virol. Methods*, doi: 10.1016/j.jviromet.2011.03.028
- WIEDMANN M., BRANDON R., WAGNER P., DUBOVI E.J. & BATT C.A. (1993). Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. *J. Virol. Methods*, **44**, 129–140.
- WYLER R., ENGELS M. & SCHWYZER M. (1989). Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV1). In: *Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs*, Wittmann G., ed. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA, 1–72.
- XIA J.Q., YASON C.V. & KIBENGE F.S. (1995). Comparison of dot blot hybridization, polymerase chain reaction, and virus isolation for detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in artificially infected bovine semen. *Can. J. Vet. Res.*, **59**, 102–109.
- YASON C.V., HARRIS L.M., MCKENNA P.K., WADOWSKA, D. & KIBENAGE F.S.B. (1995). Establishment of conditions for the detection of bovine herpesvirus-1 by polymerase chain reaction using primers in the thymidine kinase region. *Can. J. Vet. Res.*, **59**, 94–101.

*

* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la rinotraqueítis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustular infecciosa (puede consultarse la lista más actualizada 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 los Laboratorios de Referencia de la OIE para cualquier otro dato sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la rinotraqueítis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustular infecciosa.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990 COMO RINOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA BOVINA:
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2017