

FIEBRE CATARRAL MALIGNA

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: La fiebre catarral maligna (FCM) es una enfermedad aguda, generalizada y habitualmente fatal que afecta a muchas especies de Artiodactyla. Se ha descrito que la enfermedad afecta con mayor frecuencia a especies de la subfamilia Bovinae y la familia Cervidae, pero también se ha comprobado en cerdos domésticos así como en jirafas y especies de antílopes pertenecientes a la subfamilia Tragelaphinae. La FCM se caracteriza por acumulaciones e infiltraciones celulares linfoides subepiteliales, vasculitis y proliferación y necrosis linfocitaria generalizada. Se han descrito al menos diez virus de la FCM, incluidos dos virus bien conocidos: el gammaherpesvirus-1 alcefalino (HVAI-1) y el gammaherpesvirus-2 ovino (HVOv-2). HVAI-1, que se mantiene en el ñu con una infección asintomática, causa la enfermedad en bóvidos en regiones de África y en varias especies de rumiantes en zoológicos de todo el mundo. El HVOv-2, que prevalece en ovejas domésticas como una infección subclínica, es la causa de la FCM en la mayor parte del mundo. En ambos tipos de la enfermedad, los animales que la padecen clínicamente no son fuente de infección, ya que el virus solo lo excretan los hospedadores naturales, los ñus y las ovejas, respectivamente.

Descripción de la enfermedad: Normalmente, la FCM aparece de forma esporádica y afecta a unos pocos animales, aunque el HVAI-1 y el HVOv-2 pueden provocar epizootias. Existe una gradación considerable en la susceptibilidad a la forma HVOv-2 de la FCM, que va de la resistencia relativa de *Bos taurus* y *B. indicus*, pasando por el búfalo de agua, el bisonte de América del norte y muchas especies de ciervos, hasta los ciervos del Père David y las vacas de Bali, que son muy susceptibles. La enfermedad puede presentar un espectro amplio de signos clínicos que van desde la forma aguda, en la que se observan muy pocas alteraciones antes de la muerte, hasta los casos más complejos, caracterizados por fiebre alta, opacidad bilateral de la córnea, lagrimeo catarral profuso de los ojos y rinorrea, necrosis del hocico y erosión del epitelio bucal. Normalmente el diagnóstico se consigue observando las alteraciones histopatológicas características, aunque la detección del ADN vírico en cualquiera de las formas de la enfermedad se ha convertido en la opción preferida.

Identificación del agente: El HVAI-1 puede aislarse a partir de los animales afectados clínicamente utilizando leucocitos de sangre periférica o las suspensiones celulares linfoides, pero la viabilidad celular debe conservarse durante el proceso ya que en las células muertas no se puede recuperar la infectividad. También se puede aislar el virus a partir de los ñus, ya sea en los leucocitos de la sangre periférica o de las suspensiones celulares de otros órganos. Probablemente la mayoría de los cultivos en monocapas de origen rumiante son susceptibles al HVAI-1 y desarrollan un efecto citopático (ECP). Las cepas aisladas primarias producen de forma típica un ECP multinucleado en el cual se puede identificar el antígeno vírico mediante inmunofluorescencia o inmunocitoquímica empleando antisueros o anticuerpos monoclonales adecuados. El agente HVOv-2 nunca se ha aislado en cultivo, aunque líneas celulares linfoblásticas propagadas a partir de animales infectados contienen ADN específico del HVOv-2. Ambos agentes se han transmitido de forma experimental a conejos y hámsteres, y estos desarrollan las lesiones típicas de la FCM.

Se ha detectado ADN vírico en material clínico procedente de casos de FCM causada tanto por el HVAI-1 como por el HVOv-2 mediante la reacción en cadena de la polimerasa, y este se ha convertido en el método elegido para el diagnóstico de ambas formas de la enfermedad.

Pruebas serológicas: El ñu infectado, que es el hospedador natural, desarrolla invariablemente anticuerpos contra el HVAI-1, que se pueden detectar con varias pruebas, entre ellas, la

neutralización vírica, la inmunoelectrotransferencia, el enzimoimmunoanálisis (ELISA), y la inmunofluorescencia. Los anticuerpos contra el HVOv-2 pueden detectarse mediante el HVAI-1 como fuente de antígeno. Las ovejas domésticas invariablemente tienen anticuerpos que pueden detectarse mediante inmunofluorescencia, ELISA o inmunoelectrotransferencia. Sin embargo, la respuesta de anticuerpos de los animales afectados clínicamente es limitada y no desarrollan anticuerpos neutralizantes, de modo que la detección depende del empleo de pruebas de inmunofluorescencia, ELISA o de inmunoelectrotransferencia, aunque en animales afectados de forma más aguda, como el ciervo, no siempre hay anticuerpos.

Requisitos para las vacunas: No se han elaborado vacunas contra esta enfermedad.

A. INTRODUCCIÓN

1. Descripción e impacto de la enfermedad

La fiebre catarral maligna (FCM) es una enfermedad generalmente fatal de las vacas y muchas otras especies de *Artiodactyla*, que tiene lugar después de una infección por ciertos herpesvirus del género *Macavirus*. Al menos seis herpesvirus pueden causar la FCM, entre los cuales el mejor caracterizado es el gammaherpesvirus-1 alcelafino (HVAI-1) y el gammaherpesvirus-2 ovino (HVOv-2). La FCM se caracteriza por una linfoproliferación sistémica y suele ser mortal; las células infectadas son detectables en sangre y en la mayoría de tejidos en el momento de la necropsia mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos del virus. Los hospedadores naturales de estos virus, incluido el ñu (*Connochaetes* spp. de la subfamilia Alcelaphinae) en el caso del HVAI-1 y la oveja doméstica en el caso del HVOv-2, no sufren la enfermedad clínica después de la infección.

Los signos clínicos de la FCM son muy variables y van desde una forma hiperaguda a una crónica en la que, en general, los signos más evidentes aparecen en los casos más prolongados. En la forma hiperaguda, o bien no se detectan signos clínicos, o bien puede aparecer depresión seguida de diarrea o disentería durante 12–24 horas antes de la muerte. En general, el inicio de los signos se asocia a la aparición de fiebre alta, lagrimeo seroso abundante y exudado nasal, que progresa hasta una rinorrea mucopurulenta profusa. Los animales pueden perder el apetito y puede disminuir su producción láctea. De forma característica, desarrollan opacidad bilateral progresiva de la córnea, que comienza en la periferia. En algunos casos aparecen lesiones en la piel (caracterizadas por ulceración y exudación), que pueden formar costras endurecidas asociadas a la necrosis de la epidermis, y frecuentemente están restringidas al periné, las ubres y los pezones. Puede haber signos nerviosos. La salivación asociada a la hiperemia puede ser un signo precoz, que progresa hasta provocar erosiones en la lengua, el paladar duro, las encías y, de forma característica, las partes distales de las papilas bucales. Los ganglios linfáticos superficiales se pueden infartar y se pueden tumefactar las articulaciones de las extremidades.

Además, recientemente se han descrito en ciervos de Sika infectados por herpesvirus caprino-2 (HVPC-2; Foyle *et al.*, 2009 y bibliografía citada aquí) varios casos de FCM con presentación dermatológica. Estos casos presentaron lesiones cutáneas junto con vasculitis linfocítica característica de la FCM, y el HVCP-2 se detectó mediante PCR y secuenciación del ADN.

La FCM asociada al ñu tiene lugar en zonas de actividad pecuaria del este de África en las que los pastores utilizan zonas donde pastan los ñus, y en el sur de África en zonas donde los ñus y el ganado bovino pastan conjuntamente. No obstante, esta enfermedad también puede afectar a otras especies de rumiantes de zoológico de todo el mundo, y por lo tanto, además de los antílopes de las subfamilias Alcelaphinae y Hippotraginae, es aconsejable considerar susceptibles a todos los rumiantes.

La FCM asociada a las ovejas tiene lugar en todo el mundo en ganado bovino y otras especies, y suele aparecer de forma esporádica y afectando solo a uno o a unos pocos animales. No obstante, en ocasiones se producen incidentes en los que resultan afectados múltiples animales. Esta enfermedad también puede infectar y causar pérdidas considerables en el bisonte de América del Norte (*Bison bison*), el ciervo común (*Cervus elaphus*), otras especies de ciervo y el búfalo acuático (*Bubalus bubalis*), e incluso con mayor facilidad en el ciervo del Père David's deer (*Elaphurus davidianus*) y en las vacas de Bali (*Bos javanicus*).

Mediante la detección del ADN vírico en animales afectados, recientemente se han confirmado informes de varios países, y en particular de Noruega, que indican que la FCM afecta a los cerdos domésticos (Loken *et al.*, 1998; Syrjala *et al.*, 2006). La infección experimental de los cerdos con el HVOv-2 también está documentada (Li *et al.*, 2012). Los signos son muy semejantes a los que se observan en las vacas afectadas por la forma aguda.

Las especies más resistentes tienden a experimentar una infección más prolongada y lesiones floridas, mientras que en las especies más susceptibles, el curso de la enfermedad tiende a ser más corto y los signos clínicos menos drásticos. Algunos estudios también sugieren que pueden infectarse cantidades importantes de animales sin desarrollar la enfermedad clínica (por ejemplo, Lankester *et al.*, 2016)

Las alteraciones anatomopatológicas macroscópicas reflejan la gravedad de los signos clínicos, pero, generalmente, son extensos y pueden afectar a la mayoría de los sistemas orgánicos. Pueden presentarse erosiones y hemorragias en todo el tracto intestinal y los ganglios linfáticos presentan aumento de tamaño, aunque el grado en el que están afectados varía entre animales. A menudo se observan en el tracto respiratorio acumulaciones catarrales, erosiones y la formación de una membrana diftérica. Frecuentemente, en el tracto urinario se observan equimosis características en el revestimiento de la vejiga, sobre todo en el bisonte.

Las alteraciones histológicas son la base para confirmar los casos de FCM y se caracterizan por degeneración epitelial, vasculitis, hiperplasia y necrosis de los órganos linfoides, y acumulaciones intersticiales extensas de células linfoides en órganos no linfoides. Generalmente, se observa vasculitis y puede ser notable en el encéfalo, afectando a las venas, las arterias, las arteriolas y las vénulas. Se caracteriza por la infiltración de las células linfoides de la túnica adventicia y media, con frecuencia asociada a la degeneración fibrinoide. El encéfalo también puede presentar una meningoencefalitis no supurativa con manguitos perivasculares linfocíticos y un destacado aumento de la celularidad en el líquido cefalorraquídeo. La hiperplasia de los ganglios linfáticos se caracteriza por una expansión de las células linfoblásticas del paracórtex, mientras que las lesiones degenerativas se asocian generalmente a los folículos. Es habitual la acumulación intersticial de células linfoides en órganos no linfoides, en particular en el córtex renal y las zonas periportales del hígado, y, en el caso del riñón, puede ser muy extensa, con aparición de múltiples focos blancos elevados, cada uno de los cuales mide 1 a 5 mm de diámetro.

Los rasgos anatomopatológicos de la FCM, independientemente del agente implicado, son esencialmente similares. Sin embargo, además del examen histológico, los métodos de los que se dispone para el diagnóstico de la enfermedad inducida por el HVAI-1 o el HVOv-2 tienden a ser específicos del virus y se indican abajo para cada virus.

2. Naturaleza y clasificación del agente patógeno causal

La FCM está causada por virus del género *Macavirus*, subfamilia *Gammaherpesvirinae*, familia *Herpesviridae*, que comparten características de secuencia y antigenicidad e infectan a tres subfamilias de *Bovidae* (*Alcelaphinae*, *Hippotraginae* y *Caprinae*). La enfermedad causada por el HVAI-1 se limita a aquellas zonas de África en las que hay ñus, y a las especies de zoológico de cualquier otro sitio, y en un principio se calificó como FCM derivada del ñu. La forma HVOv-2 de la enfermedad tiene lugar en cualquier parte del mundo donde se practique la cría de ovejas, y se ha descrito como FCM asociada a las ovejas (FCM-AO). Ambas formas de la enfermedad pueden presentar un espectro amplio de signos clínicos, aunque las alteraciones histopatológicas características son muy similares en todos los casos. En ocasiones muy infrecuentes se han identificado macavirus diferentes del HVAI-1 y el HVOv-2 como causantes de la FCM.

3. Diagnóstico diferencial

Los signos clínicos de la forma “cabeza y ojos” de la FCM se parecen a los de otras enfermedades que causan lesiones orales (Holliman, 2005). Así, la DVB/enfermedad de las mucosas, la peste bovina, la fiebre aftosa, la lengua azul y la estomatitis vesicular pueden considerarse posibles diagnósticos diferenciales cuando se sospeche de FCM. El diagnóstico claro de la FCM puede respaldarse con otros indicios, como la detección del ADN del virus de la FCM, la respuesta de anticuerpos específicos del virus y/o alteraciones histopatológicas compatibles con la FCM.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la fiebre catarral maligna (HVAI-1 y HVOv-2) 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	Demostrar ausencia de infección en la población	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente						
PCR	+	+	+	+++	++	n/a
Aislamiento del virus	+(HVAI-1)	+(HVAI -1)	+(HVAI -1)	+(HVAI-1)	+(HVAI -1)	n/a
Detección de respuesta inmunitaria						
C-ELISA	+++	+++	+++	++	+++	++
Neutralización del virus	+(HVAI -1)	+(HVAI -1)	+(HVAI -1)	n/a	n/a	+(HVAI -1)
IFAT	+	+	–	+	–	–
Prueba de la inmuno-peroxidasa	+	+	–	+	–	–

Clave: +++ = método recomendado; validado para el fin indicado; ++ = método adecuado, pero puede precisar una validación posterior; + = puede utilizarse en ciertas situaciones, pero el coste, la fiabilidad u otros factores limitan su aplicación; – = no adecuado para esta finalidad; n/a = propósito no aplicable.

PCR= reacción en cadena de la polimerasa; C-ELISA=enzimoinmunoanálisis de competición;

IFAT= prueba de la inmunofluorescencia indirecta. Obsérvese que el aislamiento del virus y la neutralización del virus solo se han documentado para el HVAI-1.

Es importante destacar que la causa vírica de la FCM-AO no se puede aislar de manera fiable y la evidencia de OvHV-2 como causa de MCF se basa en: (a) la presencia de anticuerpos en sueros de todas las ovejas domésticas que reaccionan de forma cruzada con antígenos de HVAI-1 (Hart *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2001); (b) el desarrollo de anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con los antígenos de HVAI-1 en la mayoría de los bovinos con FCM-AO y en modelos animales infectados experimentalmente; (c) la detección de secuencias del HVOv-2 mediante PCR de ADN utilizando sangre periférica o tejidos afectados de animales con FCM-AO; (d) la secuenciación de HVOv-2 de secreciones nasales de ovejas y su uso para inducir FCM con signos clínicos e histopatológicos característicos en conejos, bovinos y bisontes (Li *et al.*, 2011; Taus *et al.*, 2006; 2007).

El diagnóstico de la FCM basado en los signos clínicos y en el examen de las lesiones anatomopatológicas macroscópicas no resulta fiable porque todo ello es extremadamente variable. El examen histológico de varios tejidos, como, por orden de preferencia, el riñón, el hígado, la vejiga urinaria, el epitelio bucal, la cornea/conjuntiva y el encéfalo, son necesarios para alcanzar un diagnóstico más certero. No obstante, ahora también se puede intentar la detección de anticuerpos contra el virus y/o de ADN vírico, y se están convirtiendo rápidamente en los métodos de elección.

La mayoría de pruebas realizadas en el laboratorio realizadas para detectar anticuerpos específicos del virus se han basado en una cepa atenuada (WC11) que se ha sometido a muchos pases de laboratorio como fuente de antígeno y de ADN vírico (Plowright *et al.*, 1960). Ahora se dispone de la secuencia completa de nucleótidos del virus virulento de bajo número de pases (C500), y constituye la base de futuros estudios de este virus (Ensser *et al.*, 1997). Los pases de laboratorio de la cepa HVAI-1 C500 dan lugar a la atenuación de la virulencia y de la capacidad de propagación sin células, así como a alteraciones genómicas (Wright *et al.*, 2003). Este derivado del HVAI-1 C500 de alto número de pases se ha utilizado como vacuna candidata para la FCM asociada al ñu y como fuente de antígeno para análisis serológicos (Haig *et al.*, 2008; Russell *et al.*, 2012). Se ha demostrado recientemente que los antígenos individuales del virus MCF, expresados en bacterias o en cultivos de células de mamíferos, son reconocidos por los sueros de animales afectados por FCM y, en el caso de las glicoproteínas

del HVOv-2, inducen anticuerpos específicos del virus en conejos hiperinmunes (Bartley *et al.*, 2014; Cunha *et al.*, 2015; Dry *et al.*, 2016)

1. Identificación del agente patógeno

1.1. Animales afectados clínicamente

1.1.1. Cultivo celular o aislamiento

Una característica llamativa de la FCM es la ausencia de antígeno vírico detectable o de alteraciones citológicas específicas del herpesvirus en las lesiones. Hasta hoy, confirmación de la infección mediante la recuperación del virus solo es posible en el caso del HVAI-1, mientras que los intentos de recuperar el virus causante de la enfermedad en casos clínicos de FCM-AO han fracasado invariablemente. No obstante, se han generado líneas celulares linfoblastoides a partir de ganado vacuno o ciervos afectados, algunas de las cuales transmiten la FCM tras ser inoculadas en animales de experimentación (Reid *et al.*, 1989).

Generalmente, la infectividad está asociada estrictamente a las células y, por tanto, el aislamiento se puede conseguir solo a partir de suspensiones celulares preparadas a partir de leucocitos de sangre periférica, de ganglios linfáticos o bien de otros tejidos afectados. Las suspensiones celulares se preparan a partir del sobrenadante de los cultivos de tejidos, aproximadamente 5×10^6 células/ml, y se inoculan en monocapas de cultivos celulares preestablecidos. Se utilizan extensamente células de tiroides de bovino, pero probablemente la mayoría de cultivos celulares en monocapa, tanto primarios como de un número bajo de pasajes, de origen rumiante proporcionará un sustrato celular adecuado para el aislamiento del HVAI-1. Después de 36–48 horas de incubación, se debe cambiar el medio de cultivo y observar las monocapas al microscopio (40x) para comprobar si existen signos evidentes de efectos citopáticos (ECP). Estos aparecen de una forma característica como focos multinucleados en las monocapas, después se retraen progresivamente hasta formar unos cuerpos densos con procesos citoplásmicos que pueden separarlos. A este proceso le sigue el recrecimiento de las monocapas normales. Un ECP puede tardar hasta 21 días en hacerse visible y rara vez se presenta antes del día 7. La infectividad en esta fase tiende a estar muy asociada a las células y, de este modo, cualquier pase posterior o almacenamiento debe emplear métodos que aseguren el mantenimiento de la viabilidad celular. Se debe determinar la identificación de la cepa utilizando un análisis por PCR o anticuerpos específicos de FCM en pruebas de fluorescencia o inmunocitoquímicas.

1.1.2. Métodos moleculares – detección del ácido nucleico vírico

De forma característica, en los tejidos afectados se puede detectar poco ADN vírico; por tanto, es necesario amplificar el genoma vírico mediante el cultivo convencional (en este caso, de HVAI-1) o mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se ha publicado la secuencia completa de la cepa C500 del HVAI-1 y de dos cepas del HVOv-2, lo cual permite diseñar cebadores para las PCR de regiones conservadas del genoma (Ensser *et al.* 1997; Hart *et al.*, 2007; Taus *et al.*, 2007). Se han desarrollado PCR anidada y en tiempo real para el HVAI-1 y para el HVOv-2 (Baxter *et al.*, 1993; Flach *et al.*, 2002; Hussy *et al.*, 2001; Traul *et al.*, 2005), mientras que se ha utilizado una PCR pan-herpesvirus (VanDevanter *et al.*, 1996) para identificar el HVCp-2 en ciervo Sika con FCM (Foyle *et al.*, 2009) y un virus asociado a ciervo de cola blanca con FCM (Li *et al.*, 2000). Esta prueba tiene por diana la secuencia génica de la polimerasa del ADN vírico y se ha utilizado para la comparación filogenética del HVAI-1 y virus relacionados (Li *et al.*, 2005a).

1.1.2.1. Protocolos de la PCR

Estos protocolos se basan en PCR anidadas publicadas diseñadas para detectar el HVOv-2 (Baxter *et al.*, 1993) o para distinguir entre el HVAI-1 y el HVOv-2 (Flach *et al.*, 2002) en muestras de ADN de hospedadores naturales o de especies afectadas por la FCM. Se han utilizado mucho métodos de extracción del ADN genómico basados en sílica, y parecen fiables. Los métodos de extracción de ADN a partir de muestras de tejido fijado deben estar validados antes de ser utilizados en estas pruebas. Un protocolo de ejemplo es el que se indica a continuación, aunque las condiciones óptimas de la reacción deben validarse para cada sistema de enzimas y tampones. No se indican protocolos para PCR en tiempo real para detectar ADN del virus de la FCM (Traul *et al.*, 2005; Hussy *et al.*, 2001), puesto que deben optimizarse para cada juego de reactivos y sistema analítico utilizados.

1.1.2.2. Protocolo 1: PCR semi-anidada para detectar ADN del HVOv-2 (Baxter *et al.*, 1993)

i) Cebadores

Nombre	Longitud	Secuencia
556	30 mer	5'-AGT CTG GGT ATA TGA ATC CAG ATG GCT CTC-3'
555	28 mer	5'-TTC TGG GGT AGT GGC GAG CGA AGG CTTC-3'
755	30 mer	5'-AAG ATA AGC ACC AGT TAT GCA TCT GAT AAA-3'

ii) Amplificación primaria (tamaño del producto: 422 bp)

Antes de la PCR, se prepara una mezcla primaria, que incluye todos los componentes excepto el ADN molde. A continuación, esta mezcla se deposita en tubos de PCR que contienen ADN problema o control. Este enfoque minimiza los errores por pipeteo cuando se analizan muchas muestras. La mezcla primaria incluye (por reacción): tampón para PCR 10x, 5 µl; MgCl₂ 25 mM, 1 µl; mezcla de dNTP 1 mM, 5 µl; cebador 556 10 µM, 1 µl; cebador 755 10 µM, 1 µl; ADN polimerasa Taq a una concentración de 5 u/µl, 0,125 µl; y agua sin nucleasa, 31,875 µl; en total son 45 µl por reacción. Se depositan muestras de 5 µl, que contienen un máximo de 1 µg de ADN problema o control, en tubos de PCR y se añaden 45 µl de la mezcla primaria a cada tubo. A continuación, estos tubos se utilizan para la PCR según el siguiente protocolo, empleando una máquina de PCR con tapa calentada. Para utilizar la máquina de PCR sin tapa calentada, debe depositarse aceite mineral sobre cada reacción de PCR para evitar la evaporación.

Las condiciones de ciclado sugeridas son las siguientes: Activación de inicio caliente o desnaturalización a 95°C durante un máximo de 15 minutos; seguida de 15 ciclos de 94°C durante 60 segundos, 60°C durante 60 segundos y 72°C durante 60 segundos; con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Las condiciones deben ajustarse según la polimerasa Taq y el termociclador que se utilice.

iii) Amplificación secundaria (tamaño del producto: 238 bp)

La mezcla primaria para la amplificación secundaria incluye (por reacción): tampón para PCR 10x, 5 µl; MgCl₂ 25 mM, 1 µl; mezcla de dNTP 1 mM, 5 µl; cebador 556 10 µM, 1 µl; cebador 555 10 µM, 1 µl; ADN polimerasa Taq a una concentración de 5 u/µl, 0,125 µl; y agua sin nucleasa, 33,875 µl; lo cual hace un volumen total del 48 µl. Se depositan muestras de 2 µl de cada producto de la amplificación primaria en tubos de PCR y se añaden 48 µl de mezcla primaria a cada tubo. Las condiciones de ciclado para la PCR secundaria son las mismas que para la PCR primaria, excepto por el hecho de que se utilizan 30 ciclos de amplificación. Tras la amplificación, deben analizarse unos 10 µl de cada PCR secundaria en gel de agarosa al 1,8% para visualizar los productos de la PCR.

1.1.2.3. Protocolo 2: PCR semi-anidada para distinguir entre ADN de HVAI-1 y ADN de HVOv-2 DNA (Flach *et al.*, 2002)

i) Cebadores

Nombre	Longitud	Secuencia*
Cebador POL1	24-mer	5'-GGC (CT)CA (CT)AA (CT)CT ATG CTA CTC CAC-3'
Cebador POL2	21-mer	5'-ATT (AG)TC CAC AAA CTG TTT TGT-3'
Cebador OHVPol	20-mer	5'-AAA AAC TCA GGG CCA TTC TG-3'
Cebador AHVPol	20-mer	5'-CCA AAA TGA AGA CCA TCT TA-3'

*Las posiciones de base entre paréntesis están degeneradas – el oligonucleótido contendrá alguna de las dos bases indicadas en estas posiciones.

Los cebadores POL1 y POL2 tienen por diana un segmento del gen de la ADN polimerasa que se conserva tanto en el HVOv-2 como en el HVAI-1, amplificando un fragmento de 386 pb. El OHVPol y el AHVPol son cebadores específicos del HVOv-2 y del HVAI-1 respectivamente, que amplifican productos de 172 pb.

ii) Amplificación primaria

Mezcla primaria, por reacción: tampón 10×, 2,5 µl; MgCl₂ 25 mM, 0,5 µl; mezcla de dNTP 1 mM, 2,5 µl; cebador POL1 10 µM, 1 µl; cebador POL2 10 µM, 1 µl; ADN polimerasa Taq (5 u/µl), 0,125 µl; y agua sin nucleasa, 12,375 µl (hasta 25 µl). Se depositan muestras de 1 µg de ADN problema y control en tubos de PCR según el siguiente protocolo: Activación de inicio caliente o desnaturalización a 95°C durante un máximo de 15 minutos; seguida de 25 ciclos de 94°C durante 60 segundos, 60°C durante 60 segundos y 72°C durante 60 segundos; con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Las condiciones deben ajustarse según la polimerasa Taq y el termociclador utilizados.

iii) Amplificación secundaria

Mezcla primaria, por reacción: tampón para PCR 10×, 2,5 µl; MgCl₂ 25 mM, 0,5 µl; mezcla de dNTP 1 mM, 2,5 µl; cebador AHVpol o OHVpol 10 µM, 1 µl; cebador POL2 10 µM, 1 µl; ADN polimerasa Taq a una concentración de 5 u/µl, 0,125 µl; y agua sin nucleasa, 12,375 µl (hasta 25 µl). Se depositan muestras de 2 µl de cada producto de la amplificación primaria en tubos de PCR y se añaden 23 µl de mezcla primaria a cada tubo. Las condiciones de ciclado para la PCR secundaria son las mismas que para la PCR primaria, excepto por el hecho de que se utilizan 30 ciclos de amplificación. Tras la amplificación, deben analizarse unos 10 µl de cada PCR secundaria en gel de agarosa al 1,8%.

1.2. Hospedadores naturales

Prácticamente todos los ñus salvajes están infectados por el HVAI-1 al llegar a los 6 meses de vida, porque el virus se propaga de forma intensiva durante el periodo perinatal (Lankester *et al.*, 2015). Se supone que las especies *Connochaetes taurinus taurinus*, *C.t. albojubatus* y *C. gnu* están infectadas por el mismo virus. La infección parece persistir también en la mayoría de grupos de ñus de los zoológicos. Sin embargo, es posible que la infección pueda estar ausente en animales que se hayan mantenido aislados durante la juventud o que vivan en grupos pequeños.

Después de la infección existe un breve periodo de tiempo en el que se excreta el virus en una forma que no precisa células para vivir y se puede aislar a partir de hisopos nasales. También se puede aislar el virus en ese momento a partir de leucocitos, pero en los animales mayores es menos probable el éxito, a menos que el animal esté inmunodeprimido por estrés o por un tratamiento farmacológico.

La oveja doméstica es el hospedador natural del HVOv-2 y probablemente todas las poblaciones de ovejas estén infectadas por el virus sin desarrollar respuesta clínica. Sin embargo, en estudios de la dinámica de la infección dentro de rebaños de ovejas se han obtenido resultados confusos, algunos de los cuales sugieren que se produce infección productiva en las primeras semanas de vida del cordero, mientras que otros sugieren que la infección de la mayoría de corderos no tiene lugar hasta los 3 meses de edad, y que la excreción del virus infeccioso tiene lugar entre los 5 y 6 meses de edad (Li *et al.*, 2004). También existen indicios de que algunos corderos podrían contraer la infección *in utero*, mientras que otros estudios sugieren que el separar a los corderos de sus madres durante la primera semana de vida permite el establecimiento de animales libres del virus. Por lo tanto, podría existir una considerable variación en la dinámica de la infección en función del rebaño observado. No obstante, indicios circunstanciales de la aparición de FCM en especies susceptibles sugieren que el rebaño de ovejas en fase perinatal es la principal fuente de infección, pero que la infección puede recrudescer periódicamente en ovejas de cualquier edad.

En ovejas o ñus adultos infectados de forma latente, la muy baja carga vírica circulante puede reducir la fiabilidad de las PCR. Sin embargo, en estos animales, debe ser detectable una clara respuesta de anticuerpos específicos del virus.

Además de la oveja doméstica, la cabra doméstica y otros miembros de la subfamilia *Caprinae* tienen anticuerpos que reaccionan con el HVAI-1 de forma similar a como lo hace el suero de las ovejas. Ello implica que estas especies están infectadas por virus similares al HVOv-2. Se ha observado que algunas cabras son positivas al HVOv-2 según una PCR, mientras que se han observado algunos casos de FCM causada por el HVCp-2 (Foyle *et al.*, 2009). Otros antílopes grandes de las subfamilias *Alcelaphinae* e *Hippotraginae* también están infectados por gammaherpesvirus que están muy relacionados desde el punto de vista antigénico (Li *et al.*, 2005a). Estas similitudes se han visto respaldadas por análisis recientes de neutralización cruzada de los virus HVAI-1 y HVOv-2 mediante sueros de especies hospedadoras reservorio, como ovinos, caprinos, antílopes o alcelafinos, lo que sugiere que el HVAI-1 puede neutralizarse con sueros de antílopes o alcelafinos, mientras que el HVOv-2 puede ser neutralizado con suero ovino o caprino (Taus *et al.*, 2015). Esto implica una

jerarquía de relación entre los virus de la FCM que puede influir en la fiabilidad de las pruebas serológicas.

2. Pruebas serológicas

2.1. Animales afectados clínicamente

La respuesta de anticuerpos de los animales afectados clínicamente es escasa, y no desarrollan anticuerpos neutralizantes. Históricamente, se han detectado anticuerpos contra el HVOv-2 empleando el HVAI-1 como fuente de antígeno, aunque se ha descrito la detección de proteínas recombinantes del HVOv-2 mediante sueros de ganado bovino afectado por FCM (Bartley *et al.*, 2014). Pueden detectarse anticuerpos contra el HVAI-1 en un 70–80% del ganado vacuno afectado clínicamente, empleando IFA o inmunoperoxidasa (IPT), pero puede no haberlos en ciervos afectados o animales que desarrollan una enfermedad aguda o hiperaguda. El enzimoimmunoanálisis de competición (C-ELISA) en el que se utiliza un MAbs que tiene como diana un epítipo conservado en los virus de la FCM se ha empleado para detectar anticuerpos en suero de rumiantes salvajes y domésticos de América del Norte (Apartado B.2.2.2.) (Li *et al.*, 2001). En un estudio comparativo del diagnóstico de la FCM mediante histopatología, el C-ELISA y la PCR específica del HVOv-2 se observó que la mayor parte del ganado vacuno clasificado como positivo a la FCM según la histopatología también tenía anticuerpos específicos del virus de la FCM detectables y ADN del HVOv-2 en sangre (Muller-Doblies *et al.*, 1998). También se han descrito ELISA directos basados en antígenos de las cepas WC11 o C500 de pase alto (HP) del HVAI-1 (Fraser *et al.* 2006; Russell *et al.*, 2012).

2.2. Hospedadores naturales

En los ñus, después de la infección parece que se desarrollan anticuerpos en todos los casos y que se pueden identificar mediante pruebas de neutralización en las que se emplea las cepas WC11 o C500 HPsin células, o mediante la inmunofluorescencia, utilizando anticuerpo anti IgG bovina, que se sabe que reacciona con la IgG de ñu. La cepa vírica Minnesota de la FCM, que no se distingue de la cepa WC11 del HVAI-1, se utiliza para la producción de antígeno para el C-ELISA.

Hasta ahora no ha habido intentos de estandarizar la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) ni la IPT, pero los dos métodos descritos a continuación se ofrecen a modo de ejemplo. El C-ELISA puede estar disponible en forma de kit comercial.

2.2.1. Neutralización vírica

Se han desarrollado pruebas para detectar los anticuerpos anti HVAI-1 tanto en el reservorio infectado de forma natural como en los hospedadores indicadores. La primera de estas es una prueba de NV en la que se emplea el virus libre de células de la cepa WC11 y en la segunda prueba se utiliza una cepa de antilope (HVAI-2). La cepa atenuada (HP) del HVAI-1 C500 también sirve. Estos virus producen antígenos de reacción cruzada y, por tanto, en las pruebas puede utilizarse cualquiera de las cepas. Esta prueba puede llevarse a cabo en placas de microtitulación con líneas celulares o células de un número bajo de pases. Las principales aplicaciones se orientan al estudio del rango y extensión de la infección natural con macavirus en las especies salvajes, las de los zoológicos y, en menor medida, en los rebaños de ovejas. También es útil en los intentos dirigidos al desarrollo de vacunas, incluida la reciente vacuna contra el HVAI-1, que indujo anticuerpos neutralizantes en plasma sanguíneo y secreciones nasales de ganado bovino (Haig *et al.*, 2008). La prueba de NV no sirve como prueba diagnóstica para los animales con infección clínica, ya que no se desarrolla ningún anticuerpo de neutralización vírica en las especies clínicamente susceptibles

Se cultiva reserva del HVAI-1 en cultivos celulares primarios o secundarios de riñón bovino, tiroides bovina, cornetes nasales bovinos, testículo bovino de bajo número de pases u otro tipo de células permisivas. El virus se conserva en alícuotas a -70°C . La reserva se titula para determinar la dilución que dé una 100 DICT₅₀ en 25 μl en las condiciones de la prueba.

2.2.1.1. Procedimiento analítico

- i) Se inactivan los sueros durante 30 minutos a 56°C en un baño de agua.
- ii) Se realizan diluciones a la mitad de los sueros problema en el medio de cultivo celular desde 1/2 a 1/16 en una placa de microtitulación para cultivo celular de 96 pocillos de fondo plano, utilizando cuatro pocillos por cada dilución y volúmenes de 25 μl por cada pocillo. En la prueba también se incluyen sueros control positivo y negativo. No se

dispone de sueros estándares, pero deben prepararse estándares internos positivos y titularse en un rango apropiado.

- iii) Se añaden 25 µl por pocillo de la reserva de virus HVAI-1 diluido en el medio de cultivo de modo que la dilución calculada proporcione 100 DICT₅₀ por pocillo.
- iv) Se incuban durante una hora a 37°C. También se incuba la reserva vírica residual.
- v) Se realiza una valoración del virus residual por retroceso, en cuatro etapas de dilución a 1/10, empleando 25 µl por pocillo y al menos cuatro pocillos por cada dilución.
- vi) Se añaden 50 µl por pocillo de suspensión celular permisiva a una densidad de 3 x 10⁵ células/ml.
- vii) Se incuban las placas en atmósfera humedecida y enriquecida con CO₂ a 37°C durante 7–10 días.
- viii) Se examinan las placas al microscopio para detectar posibles ECP. Se valida la prueba mediante valoración del virus por retroceso (que debería dar un valor de 100 DICT₅₀ con un rango permisible de 30–300) y de los sueros control. El suero estándar positivo debe dar un título de ±0,3 log₁₀ unidades respecto a su media predeterminada.
- ix) Los resultados del suero problema se determinan por el método de Spearman–Kärber como la dilución del suero que neutraliza al virus en el 50% de los pocillos.
- x) Un suero negativo no debe dar neutralización a la menor dilución probada (1/2 equivalente a la dilución de 1/4 en la etapa de neutralización).

2.2.2. Enzoinmunoanálisis de competición (C-ELISA)

El C-ELISA va dirigido a un epítipo presente en de la glicoproteína superficial principal que parece estar conservado en todos los virus de la FCM. La prueba se ha empleado para detectar anticuerpos en el suero de rumiantes salvajes y domésticos en América del Norte y en otros lugares. Ha detectado anticuerpos contra los siguientes virus causantes de FCM: HVAI-1, HVAI-2, HVOV-2, HVCp-2 y el herpesvirus de origen desconocido que se observó que causa la FCM clásica del ciervo de cola blanca, así como los virus del grupo de la FCM todavía no descritos como patógenos, tales como los del antílope del género *Oryx*, el buey almizclero (*Ovibos moschatus*) y otros (Li *et al.* 2005a). El C-ELISA tiene la ventaja de ser más rápido y presenta más rendimiento que la prueba IFI o la IPT. En una comparación de C-ELISA, PCR e histopatología para el diagnóstico de la FCM-AO (Muller-Doblies *et al.*, 1998) se sugirió que los tres métodos presentan buena concordancia.

Podría comercializarse un juego completo comercial de reactivos para el C-ELISA, que incluye placas previamente recubiertas, sueros control y MAb marcados. Se expone el siguiente protocolo para que los laboratorios que lo deseen preparen sus propias placas antigenadas. Se cubren placas de ELISA a 4°C (39°F) durante 18–20 horas con 50 µl de una solución que contenga 0,2 µg por pocillo de antígeno vírico semipurificado del la FCM (cepas Minnesota o WC11 del HVAI-1) en tampón carbonato/bicarbonato 50 mM (pH 9,0). Las placas recubiertas se bloquean a temperatura ambiente (21–25°C, 70–77°F) durante 2 horas con PBS 0,05 M que contenga sacarosa al 2%, glicina 0,1 M, seroalbúmina bovina al 0,5% y NaCl al 0,44% (pH 7,2). Después del bloqueo, se vacían los pocillos y seguidamente se secan las placas en un ambiente de baja humedad a 37°C durante 18 horas, se introducen en bolsas de plástico con desecante y se sellan y conservan a 4°C (39°F) (Li *et al.*, 2001). El MAb 15-A está conjugado con peroxidasa de rábano, que emplea un método estándar con periodato.

2.2.2.1. Procedimiento analítico

- i) Los controles positivos y negativos y las muestras problema (suero o plasma) se diluyen a 1/5 con tampón de dilución (PBS que contenga Tween 20 al 0,1%, pH 7,2).
- ii) Se añaden 50 µl de muestras diluidas control o problema a una placa antigenada (cuatro pocillos para el control negativo y dos pocillos para el control positivo). Se deja vacío el pocillo A1 como blanco para el lector de placas.
- iii) Se cubre la placa con papel parafilm y se incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente (21–25°C, 70–77°F).
- iv) Se lava la placa tres veces con tampón de lavado (el mismo que el tampón de dilución: PBS que contenga Tween 20 al 0,1%, pH 7,2).

- v) Se prepara en el momento el conjugado anticuerpo-peroxidasa en tampón de dilución según la titulación/optimización previa para cada preparación de conjugado, o según las instrucciones del fabricante.
- vi) Se añaden 50 µl del conjugado anticuerpo-peroxidasa a cada pocillo de muestra. Se cubre la placa con papel parafilm y se incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente (21–25°C, 70–77°F).
- vii) Se lava la placa tres veces con tampón de lavado.
- viii) A cada pocillo de muestra se adicionan 100 µl de solución de sustrato de tetrametilbenzidina. Se incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente (21–25°C; 70–77°F). No se elimina la solución de los pocillos.
- ix) Se frena la reacción añadiendo 100 µl de solución de parada (ácido sulfúrico 0,18 M) a cada pocillo. No se elimina la solución de los pocillos.
- x) Se leen las densidades ópticas (OD) mediante un lector de placas de ELISA a 450 nm.
- xi) Se calcula el % de inhibición:

$$100 - \frac{\text{OD de la muestra (Media)} \times 100}{\text{OD media del control negativo}} = \% \text{ de Inhibición}$$
- xii) *Interpretación de los resultados:* Si una muestra problema provoca una inhibición igual o superior al 25% se considerará positiva. Si una muestra problema provoca una inhibición inferior al 25% se considerará negativa.
- xiii) *Validación de la prueba:* La OD media del control negativo debe caer entre los valores 0,40 y 2,10. La media del control positivo debe producir una inhibición superior al 25%.

2.2.3 Inmunofluorescencia

La IFA es menos específica que la de neutralización vírica (VN) y puede utilizarse para poner de manifiesto diversas variedades de antígenos “tempranos” y “tardíos” en las monocapas de células infectadas por el HVAI-1. En vacas y en conejos infectados de forma experimental durante el periodo de incubación, y más tarde en el curso clínico de la enfermedad, se desarrollan anticuerpos que reaccionan en la prueba IFA o en la IPT, aunque las reacciones cruzadas con algunos otros herpesvirus bovinos, así como el HVOv-2, reducen el valor diagnóstico diferencial. Algunas veces, la detección de tales anticuerpos de reacción cruzada es útil para confirmar un diagnóstico de FCM-AO.

2.2.3.1. Preparación de cortes fijados

Se inoculan cultivos celulares cerca de la confluencia o cuando acaban de alcanzarla con HVVI-1 (cepa WC11). Se deben procesar en paralelo, como control, cultivos no inoculados. Después de unos 4 días (cuando se espera que aparezcan los primeros signos de ECP, pero antes de declarar visible un ECP) se tratan los cultivos como se indica seguidamente: se elimina el medio, se lava con PBS, se extraen las células con una solución de tripsina-verseno y se centrifugan aproximadamente a 800 **g** durante 5 minutos, se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) por cada frasco de plástico de cultivo celular de 800 ml.

Se realiza una prueba depositando unas pequeñas cantidades de la suspensión celular en dos pocillos de un porta multipocillo recubierto de politetrafluoroetileno; se secan al aire y se fijan con acetona. Estos pequeños depósitos se tiñen con un suero estándar positivo y el anticuerpo anti-IgG de la especie en cuestión. Se examina la incidencia de las células positivas y negativas bajo el microscopio de fluorescencia. Se ajusta la suspensión celular mediante la adición de células no infectadas y/o PBS hasta alcanzar la concentración adecuada que dará lugar a una capa única de células cuando se extiendan sobre el porta, con células positivas claramente definidas sobre un fondo de células negativas.

Un procedimiento alternativo, que es más fácil de evaluar, consiste en preparar monocapas de células infectadas y no infectadas en tubos de Leighton o en portas compartimentalizados. Las monocapas celulares se infectan a partir de 150 a 200 DICT₅₀ (dosis que causa infección en un 50% del cultivo celular) del virus que se diluye en el medio de cultivo celular. Se fijan tanto los portas infectados como los no infectados con acetona, y se guardan, como se ha indicado anteriormente, a –70°C.

2.2.3.2. Procedimiento analítico

- i) Se rehidratan los portas durante 5 minutos con PBS, se lavan con agua destilada y se secan al aire.
- ii) Los sueros se diluyen a 1/20 en PBS. Las muestras que den un fondo alto de tinción se pueden volver a analizar a diluciones mayores. Se aplican los sueros diluidos a una pequeña cantidad de células positivas a la presencia del virus de la FCM. y a otra pequeña cantidad de células control negativo para cada muestra. Se incluyen controles de suero positivo y negativo. Lo ideal es que la prueba se valide volviendo a titular el control positivo para determinar su punto final.
- iii) Se incuban a 37°C durante 30 minutos en una cámara húmeda.
- iv) Se eliminan los líquidos sobrantes. Se lavan los portas mediante dos cambios de PBS, durante 5 minutos cada uno.
- v) Se lavan con PBS durante 1 hora removiendo y, seguidamente, los portas se secan al aire.
- vi) Se aplica anticuerpo anti IgG bovina generado en conejo y conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) a una dilución de trabajo predeterminada.
- vii) Se incuban a 37°C durante 20 minutos, se elimina el líquido de los portas y se lavan dos veces con PBS durante 10 minutos cada vez.
- viii) Se les aplica tinción de contraste con azul de Evans 1/100.000 durante 30 segundos y se lavan con PBS durante 2 minutos. Se sumergen en agua destilada, se secan y se montan en PBS/glicerol (50/50).
- ix) Se examinan por microscopía de fluorescencia para detectar uniones las específicas de los anticuerpos a las células infectadas.

2.2.4. Prueba de inmunoperoxidasa

Se prepara una dilución del HVAI-1 cultivado en células de cornetes nasales bovinos (BT) que contenga aproximadamente 10^3 DICT₅₀ en una suspensión de células BT recién tripsinizadas y se inocula en tubos de Leighton con cubreobjetos, 1,6 ml por tubo, o en portas de cuatro cámaras, 1,0 ml por cámara.

Se examinan los cultivos celulares a los 4–6 días para detectar posibles ECP y se fijan con acetona cuando comiencen los signos de ECP. Se quitan las cámaras de plástico, pero no las gomas, de las cámaras de los portas antes de la etapa de fijación y para esta se emplea acetona (p.ej. grado Ultimar) que no degrada las gomas. Las células fijadas se conservan a –70°C.

2.2.4.1. Procedimiento analítico

- i) Se prepara el diluyente de la IPT (21,0 g de NaCl y 0,5 ml de Tween 20 se adicionan a 1 litro de PBS 0,01 M, pH 7,2) y el líquido de lavado (0,5 ml de Tween 20 se añaden a 1 litro de PBS 0,01 M, pH 7,2).
- ii) Se diluye el suero problema a 1/20 en el diluyente de la IPT y se extienden 150–200 µl sobre un cubreobjetos fijado o una cámara de un porta infectados con el virus.
- iii) Se incuban el cubreobjetos en una cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos.
- iv) Se sumerge el cubreobjetos tres veces en líquido de lavado.
- v) Se extienden 150–200 µl de anticuerpo anti IgG bovina marcado con peroxidasa (1/5000 en diluyente de la IPT) sobre el cubreobjetos o sobre la cámara del porta.
- vi) Se incuban el cubreobjetos o el porta en una cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos.
- vii) Se sumerge el cubreobjetos tres veces en líquido de lavado.
- viii) Se diluye en sustrato AEC (3-amino-9-etilcarbazol, 20 mg/ml en dimetil formamida) en agua destilada (5 ml de agua destilada, dos gotas de tampón acetato de sodio 50 mM de pH 5,0, dos gotas de peróxido de hidrógeno (30%) y 3 gotas de AEC) y se aplica al cubreobjetos o a la cámara del porta.
- ix) Se incuban en una cámara húmeda a 37°C durante 8–10 minutos.
- x) Se sumerge el cubreobjetos en agua destilada, se seca al aire y se monta en un porta de cristal. Las cámaras del porta compartimentalizado se examinan una vez secas.

- xi) El porta se examina al microscopio óptico. La presencia de un color rojizo-parduzco en los núcleos de las células infectadas indica una reacción positiva.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

Actualmente no existe ninguna vacuna para esta enfermedad.

La vacuna contra la FCM podría plantearse en especies de abasto que estén más expuestas o sean más susceptibles a la FCM, como el ganado bovino de determinadas regiones del este y el sur de África, donde es habitual la cría del ñu, y en las vacas de Bali, el bisonte de América del Norte, el ciervo de abasto en todo el mundo y especies de zoológico susceptibles. La vacunación de hospedadores reservorios, como el ñu o las ovejas, es improbable que sea comercialmente viable, y este es también el caso de la mayor parte de rebaños vacunos con riesgo de FCM-AO esporádica. Se han realizado varios intentos de producir una vacuna protectora contra la forma VHAI-1 de la enfermedad, con resultados decepcionantes. No obstante, en estudios recientes que se han centrado en estimular títulos altos de anticuerpos neutralizantes en secreciones nasales de ganado bovino se han obtenido resultados esperanzadores (Haig *et al.*, 2008). Esta vacuna viva atenuada indujo protección frente a la exposición experimental por vía intranasal al HVAI-1 patógeno. También se observó que la protección persistía al menos 6 meses (Russell *et al.*, 2012). Este enfoque es probable que sea el objetivo de la futura investigación, con ensayos de campo.

Dado que el HVOv-2 no puede propagarse bien en el laboratorio, no se ha intentado desarrollar ninguna vacuna. No obstante, el trabajo reciente llevado a cabo para desarrollar un sistema de exposición al HVOv-2 empleando virus de secreciones nasales de ovejas (Taus *et al* 2006) hace que tal vez sea posible comprobar posibles candidatos a una vacuna contra el HVOv-2.

BIBLIOGRAFÍA

BARTLEY K., DEANE D., PERCIVAL A., DRY I.R., GRANT D. M., INGLIS N.F., MCLEAN K., MANSON E.D., IMRIE L.H., HAIG D.M., LANKESTER F. & RUSSELL G.C. (2014). Identification of immuno-reactive capsid proteins of malignant catarrhal fever viruses. *Vet. Microbiol.*, **173**, 17–26.

BAXTER S.I.F., POW I., BRIDGEN A. & REID H.W. (1993). PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. *Arch. Virol.*, **132**, 145–159.

CUNHA C.W., KNOWLES D.P., TAUS N.S., O'TOOLE, D., NICOLA A.V., AGUILAR H.C. & LI H. (2015). Antibodies to ovine herpesvirus 2 glycoproteins decrease virus infectivity and prevent malignant catarrhal fever in rabbits. *Vet. Microbiol.*, **175**, 349–355.

DRY I., TODD H., DEANE D., PERCIVAL A., MCLEAN K., INGLIS N.F., MANSON E.D.T., HAIG D.M., NAYUNI S., HUTT-FLETCHER L.M., GRANT D.M., BARTLEY K., STEWART J.P. & RUSSELL G.C. (2016). Alcelaphine herpesvirus 1 glycoprotein B: recombinant expression and antibody recognition. *Arch. Virol.*, **161**, 613–619.

ENSSER A., PFLANZ R. & FLECKSTEIN B. (1997). Primary structure of the alcelaphine herpes virus 1 genome. *J. Virol.*, **71**, 6517–6525.

FLACH E.J., REID H., POW I. & KLEMT A. (2002). Gamma-herpesvirus carrier status of captive artiodactyls. *Res. Vet. Sci.*, **73**, 93–99.

FOYLE K.L., FULLER H.E., HIGGINS R.J., RUSSELL G.C., WILLOUGHBY K., ROSIE W.G., STIDWORTHY M.F. & FOSTER A.P. (2009). Malignant catarrhal fever in sika deer (*Cervus nippon*) the UK. *Vet. Rec.*, **165**, 445–447.

FRASER S.J., NETTLETON P.F., DUTIA B.M., HAIG D.M. & RUSSELL G.C. (2006). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against malignant catarrhal fever viruses in cattle serum. *Vet. Microbiol.*, **116**, 21–28.

HAIG D.M., GRANT D., DEANE D., CAMPBELL I., THOMSON J., JEPSON C., BUXTON D. & RUSSELL G.C. (2008). An immunisation strategy for the protection of cattle against alcelaphine herpesvirus-1-induced malignant catarrhal fever. *Vaccine*, **35**, 4461–4468.

HART J., ACKERMAN M., JAYAWARDANE G., RUSSELL G., HAIG D.M., REID H. & STEWART J.P. (2007). Complete sequence and analysis of the ovine herpesvirus 2 genome. *J. Gen. Virol.*, **88**, 28–39.

- HOLLIMAN A. (2005). Differential diagnosis of diseases causing oral lesions in cattle. *In Practice*, **27**, 2–13.
- HUSSY D., STAUBER N., LEUTENEGGER C.M., RIDER S. & ACKERMAN M. (2001). Quantitative fluorogenic PCR assay for measuring ovine herpesvirus 2 replication in sheep. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **8**, 123–128.
- LANKESTER F., LUGELO A., MNYAMBWA N., NDABIGAYE A., KEYYU J., KAZWALA R., GRANT D.M., RELF V., HAIG D.M., CLEAVELAND S. & RUSSELL G.C. (2015). Alcelaphine Herpesvirus-1 (Malignant Catarrhal Fever Virus) in Wildebeest Placenta: Genetic Variation of ORF50 and A9.5 Alleles. *PLoS one*, **10**, e0124121.
- LANKESTER F., RUSSELL G.C., LUGELO A., NDABIGAYE A., MNYAMBWA N., KEYYU J., KAZWALA R., GRANT D., PERCIVAL A., DEANE D., HAIG D.M. & CLEAVELAND S. (2016). A field vaccine trial in Tanzania demonstrates partial protection against malignant catarrhal fever in cattle. *Vaccine*, **34**, 831–838.
- LI H., BROOKING A., CUNHA C.W., HIGHLAND M.A., O'TOOLE D., KNOWLES D.P. & TAUS N.S. (2012). Experimental induction of malignant catarrhal fever in pigs with ovine herpesvirus 2 by intranasal nebulization. *Vet. Microbiol.*, **159**, 485–489.
- LI H., CUNHA C.W., GAILBREATH K.L., O' TOOLE D., WHITE S.N., VANDERPLASSCHEN A., DEWALS B., KNOWLES D.P. & TAUS N.S. (2011). Characterization of ovine herpesvirus 2-induced malignant catarrhal fever in rabbits. *Vet. Microbiol.*, **150**, 270–277.
- LI H., DYER N., KELLER J. & CRAWFORD T.B. (2000). Newly recognized herpesvirus causing malignant catarrhal fever in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 1313–1318.
- LI H., GAILBREATH K., FLACH E.J., TAUS N.S., COOLEY J., KELLER J., RUSSELL G.C., KNOWLES D.P., HAIG D.M., OAKS J.L., TRAU D.L. & CRAWFORD T.B. (2005). A novel subgroup of rhadinoviruses in ruminants. *J. Gen. Virol.*, **86**, 3021–3026.
- LI H., MCGUIRE T.C., MULLER-DOBLIES U.U. & CRAWFORD T.B. (2001). A simpler, more sensitive competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to malignant catarrhal fever virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 361–364.
- LI H., TAUS N.S., LEWIS G.S., KIM O., TRAU D.L. & CRAWFORD T.B. (2004). Shedding of ovine herpesvirus 2 in sheep nasal secretions: the predominant mode for transmission. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5558–5564.
- LOKEN T., ALEKSANDERSEN M., REID H. & POW I. (1998). Malignant catarrhal fever caused by ovine herpesvirus-2 in pigs in Norway. *Vet. Rec.*, **143**, 464–467.
- MULLER-DOBLIES U.U., LI H., HAUSER B., ADLER H. & ACKERMANN M. (1998). Field validation of laboratory tests for clinical diagnosis of sheep-associated malignant catarrhal fever. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2970–2972.
- LOWRIGHT W., FERRIS R.D. & SCOTT G.R. (1960). Blue wildebeest and the aetiological agent of bovine catarrhal fever. *Nature*, **188**, 1167–1169.
- REID H.W., BUXTON D., POW I. & FINLAYSON J. (1989). Isolation and characterisation of lymphoblastoid cells from cattle and deer affected with 'sheep-associated' malignant catarrhal fever. *Res. Vet. Sci.*, **47**, 90–96.
- RUSSELL G.C., BENAVIDES J., GRANT D., TODD H., DEANE D., PERCIVAL A., THOMSON J., CONNELLY M. & HAIG D.M. (2012). Duration of protective immunity and antibody responses in cattle immunised against alcelaphine herpesvirus-1-induced malignant catarrhal fever. *Vet. Res.*, **43**, 51.
- TAUS N.S., CUNHA C.W., MARQUARD J., O'TOOLE D. & LI H. (2015). Cross-Reactivity of Neutralizing Antibodies among Malignant Catarrhal Fever Viruses. *PLoS one*, **10**, e0145073.
- TAUS N.S., HERNDON D.R., TRAU D.L., STEWART J.P., ACKERMANN M., LI,H., KNOWLES D.P., LEWIS G.S. & BRAYTON K.A. (2007). Comparison of ovine herpesvirus 2 genomes isolated from domestic sheep (*Ovis aries*) and a clinically affected cow (*Bos bovis*). *J. Gen. Virol.*, **88**, 40–45.
- TAUS N.S., OAKS J.L., GAILBREATH K., TRAU D.L., O'TOOLE D. & LI H. (2006). Experimental aerosol infection of cattle (*Bos taurus*) with ovine herpesvirus 2 using nasal secretions from infected sheep. *Vet. Microbiol.*, **116**, 29–36.
- TRAU D.L., ELIAS S., TAUS N.S., HERRMANN L.M., OAKS J.L. & LI H. (2005). A real-time PCR assay for measuring alcelaphine herpesvirus-1 DNA. *J. Virol. Methods*, **129**, 186–190.

VANDEVANTER D.R., WARRENER P., BENNET L., SCHULTZ E.R., COULTER S., GARBER R.L. & ROAS, T.M. (1996). Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 1666–1671.

WRIGHT H., STEWART J.P., IRERI R.G., CAMPBELL I., POW I., REID H.W. & HAIG D.M. (2003). Genome re-arrangements associated with loss of pathogenicity of the γ -herpesvirus alcelaphine herpesvirus-1. *Res. Vet. Sci.*, **75**, 163–168.

*
* *

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.