

SÍNDROME RESPIRATORIO DE ORIENTE MEDIO (INFECCIÓN DE LOS DROMEDARIOS POR EL CORONAVIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO DE ORIENTE MEDIO)

RESUMEN

Descripción de la enfermedad: El síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) es una infección respiratoria vírica de humanos y dromedarios causada por un coronavirus llamado coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV). El MERS-CoV es un virus de ARN monocatenario dextrógiro y con envoltura perteneciente al género Betacoronavirus, identificado por primera vez en 2012. Desde julio de 2015, se ha descrito la infección por MERS-CoV en más de 21 países, por lo que el MERS-CoV se ha convertido en una gran preocupación para la salud pública.

Varios estudios han confirmado que los dromedarios (*Camelus dromedarius*) son el hospedador natural y la fuente zoonótica de la infección por MERS-CoV en los seres humanos. Otras especies pueden ser susceptibles a la infección por MERS-CoV, sin embargo, no se ha demostrado su importancia epidemiológica. Se ha descrito que el MERS-CoV causa poca o ninguna enfermedad en los camellos, y las infecciones a veces se han asociado a signos respiratorios leves que consisten en secreción nasal, lagrimeo y fiebre leve en los camellos jóvenes. Si bien el impacto del MERS-CoV en la salud animal es muy bajo, las infecciones humanas tienen un impacto significativo en la salud pública.

Detección del agente: los hisopos nasales son las muestras preferidas para la detección de laboratorio de la infección por MERS-CoV en los camellos. Pueden cribarse en busca de ARN de MERS-CoV utilizando una RT-PCR en tiempo real dirigida al extremo 5' del gen de la envoltura. La presencia de ácido nucleico vírico puede confirmarse mediante un resultado de RT-PCR positivo en las dos dianas genómicas específicas, por ejemplo, mediante una RT-PCR en tiempo real dirigida al gen del marco de lectura abierto 1a o a una única diana con secuenciación de una segunda.

Pruebas serológicas: pueden analizarse muestras de suero para detectar la presencia de anticuerpos específicos del MERS-CoV mediante un enzoinmunoanálisis para el MERS-CoV, un ensayo de neutralización del MERS-CoV o un ensayo de neutralización de pseudopartículas del MERS-CoV.

Requisitos para las vacunas: se está llevando a cabo investigación sobre el desarrollo de la vacuna para camellos contra el MERS-CoV.

A. INTRODUCCIÓN

El coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) es un virus zoonótico de los dromedarios (*Camelus dromedarius*) que causa una mortalidad y morbilidad significativas en humanos en la Península Arábiga, y que se describió por primera vez en Arabia Saudita en 2012 (Zaki *et al.*, 2012). Se han producido y siguen teniendo lugar casos humanos esporádicos de MERS en un amplio rango geográfico, y la mayoría de los casos se han notificado en la Península Arábiga.

El MERS-CoV pertenece al linaje C del género Betacoronavirus, en la familia Coronaviridae, del orden Nidovirales. MERS-CoV es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo con envoltura, y su genoma de ARN monocatenario tiene un tamaño de aproximadamente 30 kb (Chan *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que los dromedarios son el reservorio natural desde donde puede producirse el contagio a los humanos (Haagmans *et al.*, 2014). También se han descrito infecciones de persona a persona, especialmente en entornos sanitarios (Hui *et al.*, 2018). Aunque África tiene el mayor número de dromedarios y el MERS-CoV es endémico en estos camellos, el MERS humano zoonótico adquirido localmente está confinado a la Península Arábiga y hasta la fecha no se ha descrito en África. Existen diferencias genéticas y fenotípicas en el virus en función de las distintas partes de África, las cuales pueden explicar en parte las diferencias en el potencial zoonótico, lo que destaca la necesidad de estudios del MERS-CoV en la interfaz animal-humano (Chu *et al.*, 2018). La falta de información de vigilancia de rutina sobre la circulación del MERS-CoV en dromedarios restringe los conocimientos sobre la dinámica de transmisión y la epidemiología en las poblaciones de dromedarios (Aguanno *et al.*, 2018).

Los estudios publicados han indicado que se han identificado MERS-CoV o ARN vírico de MERS-CoV en dromedarios de países de Oriente Medio y África septentrional; se han identificado anticuerpos contra MERS-CoV en muestras tomadas de camellos de Oriente Medio y África. Se han detectado anticuerpos contra MERS-CoV con un rango de prevalencia de 0 a 100% en poblaciones de camellos de países de Oriente Medio y África. El MERS-CoV de los dromedarios lo contraen principalmente los dromedarios de menos de 1 año de edad, y la proporción de seropositividad aumenta con la edad hasta una seroprevalencia del 100% en dromedarios adultos (Wernery *et al.*, 2017). En general, solo se han observado signos clínicos menores de la enfermedad en dromedarios infectados y la mayoría de las infecciones por MERS-CoV no parecen causar ningún signo clínico (Chu *et al.*, 2014). También se han detectado infecciones por MERS-CoV en camellos con anticuerpos MERS-CoV, tanto en animales de corta edad con anticuerpos maternos como en camellos más viejos que ya habían generado anticuerpos por una infección anterior. Sin embargo, la replicación y la carga del virus son generalmente menores en los animales seropositivos infectados que en los camellos seronegativos (Meyer *et al.*, 2016).

Los signos clínicos de la enfermedad en camellos que se han descrito después de infecciones experimentales y de campo son secreción nasal, fiebre y pérdida de apetito (Adney *et al.*, 2014; Hemida *et al.*, 2014; Khalafalla *et al.*, 2015) Sikkema *et al.* (2019) proporciona una revisión sistemática del estado global del MERS-CoV en los dromedarios.

En condiciones experimentales, la enfermedad observada en dromedarios adultos jóvenes fue clínicamente benigna con ausencia de enfermedad manifiesta y con una gran cantidad de MERS-CoV y ARN vírico detectado en muestras de hisopos nasales de camellos. El examen histopatológico reveló que el virus infeccioso se detectó en el tracto respiratorio superior, incluidos los cornetes nasales, el epitelio olfatorio, la faringe y la laringe. Específicamente, el epitelio respiratorio de los cornetes nasales es el sitio predominante de replicación de MERS-CoV en los camellos. En el tracto respiratorio inferior, se detectó virus infeccioso en la tráquea. No se detectaron antígenos víricos ni lesiones en los alvéolos. Las grandes cantidades de MERS-CoV presentes en las secreciones nasales sugieren que la transmisión de camello a camello y de camello a humano puede ocurrir fácilmente a través del contacto directo, así como por gotitas grandes, o posiblemente por fómites (Adney *et al.*, 2014).

Se han detectado anticuerpos contra MERS-CoV en llamas y alpacas (David *et al.*, 2018; Reusken *et al.*, 2016). Naturalmente, otras especies de animales, como ovejas, cabras, ganado vacuno, búfalos de agua y aves silvestres, han dado negativo en las pruebas de presencia de anticuerpos contra MERS-CoV (Hemida *et al.*, 2013; Reusken *et al.*, 2016). Sin embargo, recientemente, un informe de África que siguió a la vigilancia de otras especies de mamíferos domésticos, como ovejas, cabras, vacas y asnos que estaban en contacto con camellos infectados, encontró que los animales eran seropositivos para MERS-CoV; por lo tanto, el ganado doméstico en contacto con camellos infectados por MERS-CoV puede estar en riesgo de infección (Kandeil *et al.*, 2019). También se ha demostrado que los camellos bactrianos y los híbridos de dromedario y bactriano pueden infectarse de manera natural por MERS-CoV cuando se llevan a países donde se crían dromedarios (Lau *et al.*, 2020).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico siempre debe basarse en una combinación de técnicas teniendo en cuenta los antecedentes, el propósito de la prueba y el estadio de la infección sospechada. Para una interpretación definitiva, se debe evaluar cuidadosamente y de forma combinada la información epidemiológica, clínica y de laboratorio.

Los hisopos nasales son las muestras preferidas para la detección de laboratorio de la infección por MERS-CoV en camellos. El ARN vírico se puede extraer usando cualquiera de los kits comerciales y luego se puede cribar

en busca de ARN de MERS-CoV usando una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) convencional o en tiempo real dirigida al extremo 5' del gen de la envoltura (UpE). Las muestras positivas deben confirmarse mediante una RT-PCR en tiempo real dirigida a los genes del marco de lectura abierto 1a (ORF1a) o 1b (ORF1b). La presencia de ácido nucleico vírico se puede confirmar mediante un resultado positivo en la RT-PCR dirigida a las dos dianas genómicas específicas, ya sea mediante una RT-PCR en tiempo real dirigida al gen del marco de lectura abierto 1a (ORF1a) o dirigida a un único gen diana con secuenciación de una segunda diana. Se pueden cribar muestras de suero para detectar la presencia de anticuerpos específicos contra MERS-CoV utilizando un ensayo de inmunoenzimático (ELISA) para MERS-CoV, un ensayo de neutralización de MERS-CoV o una prueba de neutralización de pseudopartículas de MERS-CoV.

La obtención de muestras y su transporte al laboratorio deben cumplir con las normas del Capítulo 1.1.2 *Obtención, envío y conservación de muestras para el diagnóstico* y del Capítulo 1.1.3 *Transporte de materiales biológicos*.

Todos los métodos analíticos descritos a continuación deben validarse en cada laboratorio que los utilice (véase el Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas*).

Las manipulaciones en el laboratorio deben realizarse siguiendo los procedimientos de bioseguridad y bioprotección apropiados según lo determine un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: Norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y las instalaciones para los animales*).

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de MERS 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
Detección del agente						
RT-PCR en tiempo real	–	+++	+	+++	+++	–
Detección del antígeno	–	+	+	++	++	–
Aislamiento e identificación del virus	–	+	–	+++	–	–
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA de IgG indirectos	++	–	++	–	++	+
Prueba de neutralización con pseudopartículas	+	–	+	–	+	+++
PRNT	+	–	+	–	+	+++
VNT	+	–	+	–	+	+++

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = adecuado en muy pocas circunstancias; – = no adecuado para este propósito.

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; IgG ELISA = ensayo de inmunoenzimático de IgG; PRNT = prueba de neutralización por reducción de placas; VN = neutralización vírica.

1. Detección del agente

1.1. Obtención y conservación de las muestras

Los hisopos nasales son las muestras preferidas para el aislamiento del virus. Se toman hisopos de algodón simple estéril de ambas fosas nasales insertando los hisopos profundamente en la cavidad

nasal y girándolos de 10 a 20 veces en la nariz. Estos hisopos se sumergen inmediatamente en un medio de transporte vírico complementado con antibióticos (p. ej., medio de cultivo tisular 199 con albúmina sérica bovina (BSA) al 5%, bencilpenicilina (2×10^6 UI/litro), estreptomycin (200 mg/litro), polimixina B (2×10^6 UI/litro), gentamicina (250 mg/litro), nistatina ($0,5 \times 10^6$ UI/litro), clorhidrato de ofloxacina (60 mg/litro) y sulfametoxazol (0,2 g/litro). Las muestras pueden conservarse en una caja con bolsas de hielo si se va a disponer de un congelador a -80°C en 48 horas o pueden congelarse en un tanque de nitrógeno líquido inmediatamente después de la toma. Los hisopos deben procesarse inmediatamente después de su llegada al laboratorio o conservarse en un congelador a -80°C hasta su uso.

1.2. Aislamiento en cultivo celular

- i) Procedimiento analítico (Chu *et al.*, 2014; Woo *et al.*, 2016)
 - a) El día anterior a la inoculación de las muestras, se preparan pocillos de células de riñón de mono verde africano (Vero) (formato de 24 pocillos) que puedan alcanzar un 80% de confluencia al día siguiente. Además de las células Vero, otras líneas celulares comunes, como las células de epitelio renal de mono rhesus (LLC-MK2) y las células cancerosas de hígado humano (Huh 7), también se pueden utilizar para el aislamiento de virus.
 - b) Las muestras descongeladas se agitan en vórtex brevemente, y a continuación se aplica una breve centrifugación a 1 000 **g** durante 5 minutos.
 - c) Las muestras se pueden filtrar a través de un filtro de 0,45 μm (opcional)
 - d) Se recupera el cultivo de células Vero preparado y se lavan las células suavemente con solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril tres veces.
 - e) Se agregan 300 μl de una muestra a un pocillo designado de células Vero.
 - f) Se incuba la mezcla a 37°C en una incubadora de CO_2 durante 1 hora
 - g) Se recupera la placa y se agregan 700 μl de medio de cultivo de virus (DMEM [medio de Eagle modificado por Dulbecco] con un 1% de Pen/Strep, un 1% de piruvato de sodio y un 2% de suero fetal bovino) en cada pocillo. A continuación, las células tratadas se cultivan en una incubadora de CO_2 durante 24 horas.
 - h) Se retira el inóculo después de la incubación y se agrega 1 ml de medio de cultivo de virus fresco a cada pocillo. Luego, las células tratadas se cultivan durante otros 3-5 días.
 - i) Todos los días, se comprueba al microscopio si hay efecto citopático (CPE). Las células infectadas muestran ECP cuando son células gigantes redondeadas, agregadas y granuladas que se desprenden de la monocapa aproximadamente el día 3 después de la infección
 - j) Se recolecta el sobrenadante de los cultivos en los que el 60% de las células presentan CPE.
 - k) Se preparan alícuotas del sobrenadante y se conservan en un congelador a -80°C hasta su uso.
 - l) Se confirma la identidad del virus aislado mediante RT-PCR específica de MERS-CoV

1.3. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en tiempo real

Las pruebas descritas actualmente son un ensayo dirigido al extremo 5' del gen de la proteína E (UpE) y un ensayo dirigido al marco de lectura abierto 1b (ORF 1b) y/o un ensayo dirigido al ORF 1a. El ensayo dirigido al gen UpE se recomienda para el cribado, mientras que el ensayo dirigido a los ORF 1b o 1a se recomienda para la confirmación. Hay muchos kits a la venta de la RT-PCR en tiempo real para MERS-CoV dirigida a la diana UpE, pero estos carecen de la validación adecuada para su uso con muestras de camello (Mohamed *et al.*, 2017). Por lo tanto, cualquier kit que se utilice debe validarse de acuerdo con las normas de la OIE (Capítulo 1.1.6) en cada laboratorio antes de que pueda usarse para el diagnóstico de rutina.

1.3.1. RT-PCR en tiempo real dirigida al extremo 5' del gen de la proteína E (UpE)

El protocolo recomendado se basa en el método descrito por Corman *et al.* (2012a).

- i) Procedimiento analítico
 - a) Los hisopos nasales son las muestras preferidas para la detección de laboratorio de la infección por MERS-CoV en camellos. Se han descrito diferentes métodos para el

aislamiento de ARN y existe una gran variedad de kits comerciales; el paso de extracción del ARN debe ser apropiado para la muestra que se va a analizar y también debe estar validado en el laboratorio

- b) La transcripción inversa se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Existen a la venta muchos kits de RT-PCR de uno o dos pasos formulados para su aplicación con sondas y todos deberían proporcionar resultados satisfactorios.
- c) Se prepara una mezcla primaria para el número de muestras que se vayan a analizar más una muestra adicional. Por ejemplo, 12,5 µl de tampón de reacción 2× proporcionado con el sistema de RT-PCR de un solo paso con polimerasa Taq que contenga cada uno de los dNTP a una concentración de 0,4 mM y sulfato de magnesio 3,2 mM, 1 µl de mezcla de transcriptasa inversa/Taq, 0,4 µl de una mezcla de solución de sulfato de magnesio 50 mM, 1 µg de BSA no acetilada, cebador upE directo (GCA-ACG-CGC-GAT-TCA-GTT) y cebador upE inverso (GCC-TCT-ACA-CGG-GAC-CCA -TA) ambos a una concentración de 400 nM, así como sonda upE-Prb (6-carboxifluoresceína [FAM]) - CTC-TTC-ACA-TAA-TCG-CCC-CGA-GCT-CG-6-carboxi-N, N, N, N'- tetrametilrodamina [TAMRA]) a una concentración de 200 nM.
- d) Se añaden 20 µl de mezcla de reacción de PCR a cada tubo de PCR o pocillo de una placa de PCR en tiempo real seguidos de 5 µl del ARN preparado para obtener un volumen de reacción final de 25 µl. Se centrifuga durante 1 minuto en una centrífuga adecuada.
- e) Se colocan los tubos o la placa en un termociclador en tiempo real para la amplificación por PCR y se ejecuta el siguiente programa: 55°C durante 20 minutos, seguido de 95°C durante 3 minutos y luego 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 58°C durante 30 segundos.
- f) El BSA se puede omitir si se utiliza un instrumento de PCR con tubos de plástico, ya que este componente solo sirve para permitir el ciclado de PCR basado en capilares de vidrio.
- g) El procedimiento proporcionado puede requerir modificaciones para adaptarse a los diferentes requisitos del equipo de RT-PCR o de cada laboratorio.
- h) Los diagnósticos basados en RT-PCR en tiempo real deben interpretarse con precaución porque un resultado positivo de RT-PCR no indica necesariamente la presencia de virus infecciosos (MacLachlan *et al.*, 1994). Además, los resultados de este procedimiento son difíciles de correlacionar cuantitativamente con el título del virus debido al desequilibrio entre las transcripciones de genoma y subgenoma vírico (Corman *et al.*, 2012a)
- i) Para que los resultados sean válidos, el control positivo debe dar la curva de amplificación y no debe observarse ninguna curva en el control negativo.
- j) El ciclo umbral (valor Ct) utilizado en la interpretación de los resultados debe ser definido por cada laboratorio utilizando material de referencia apropiado.

1.3.2. RT-PCR en tiempo real dirigida al marco de lectura abierto 1b (ORF 1b)

El ensayo dirigido al ORF 1b se ejecuta en las mismas condiciones que la RT-PCR en tiempo real dirigida al UpE, excepto que las secuencias de cebador y sonda son: cebador directo ORF1b- (TTC-GAT-GTT-GAG-GGT-GCT-CAT), cebador inverso ORF1b (TCA-CAC-CAG-TTG-AAA-ATC-CTA-ATT-G) y sonda ORF1b-Prb (6-carboxifluoresceína [FAM]) - CCC-GTA-ATG-CAT-GTG-GCA-CCA-ATG- T-6-carboxi N, N, N, N'- tetrametilrodamina [TAMRA]) (Corman *et al.*, 2012a).

1.3.3. RT-PCR en tiempo real dirigida al marco de lectura abierto 1a (ORF 1a)

El procedimiento para realizar esta prueba está descrito por Corman *et al.* (2012b). Las condiciones también son las mismas que para la RT-PCR en tiempo real dirigida a UpE, excepto porque las secuencias de cebador y sonda son: cebador directo Orf1a (CCA-CTA-CTC-CCA-TTT-CGT-CAG) y cebador inverso Orf1a (CAG-TAT -GTG-TAG-TGC-GCA-TAT-AAG-CA), así como sonda Orf1a-Prb 200 nM (6-carboxifluoresceína [FAM]) -TTG-CAA-ATT-GGC-TTG-CCC-CCA-CT- 6-carboxi-N, N, N, N'-tetrametilrodamina [TAMRA]) (Corman *et al.*, 2012b).

1.4. Detección de antígeno

1.4.1. Prueba inmunocromatográfica (ICT) para MERS-CoV

Este procedimiento se utiliza para detectar MERS-CoV directamente a partir de muestras de camellos sospechosos y se puede utilizar en el campo o en laboratorios para un diagnóstico rápido. El ensayo se basa en la detección inmunocromatográfica de la proteína nucleocápsida

frente al MERS-CoV mediante una prueba de tira rápida (Song *et al.*, 2015). Se comercializan kits que detectan el antígeno recombinante de la nucleocápside de MERS-CoV. Los kits deben validarse para cada especie de interés y para los fines específicos para los que se utilizarán. Consulte el Registro de la OIE de los kits certificados por la OIE.

Este procedimiento es apto para la detección cualitativa de antígenos de MERS-CoV a partir de hisopos nasales o nasofaríngeos o aspirados nasales de dromedarios, con los siguientes fines:

- i) Detección de rebaños infectados por MERS-CoV (prueba de rebaño) con animales gravemente infectados con altas cargas de virus;
- ii) Prueba complementaria para estimar la prevalencia de la infección para facilitar el análisis de riesgos, como por ejemplo, en estudios, planes de salud del rebaño y programas de control de enfermedades.

Para la preparación de la muestra, se utiliza un hisopo estéril individual y nuevo para cada camello. Se toman las muestras de hisopo nasal con un hisopo estéril. Se inserta el hisopo por la fosa nasal que presenta más secreción. Se gira el hisopo varias veces sobre el epitelio respiratorio nasal. La muestra de hisopo debe colocarse inmediatamente en tubos estériles que contengan 2-3 ml de medio de transporte para virus o el tubo de diluyente del ensayo.

- i) Procedimiento analítico
 - a) Se inserta cada muestra de hisopo sin medio de transporte en el tubo de diluyente del ensayo, se hace girar la cabeza del hisopo contra el interior del tubo de diluyente del ensayo, se exprime el tampón sobrante del hisopo y se saca el hisopo. Los hisopos obtenidos se tratan en un medio de transporte de la misma manera.
 - b) Se dispensan 100 µl del tubo de diluyente del ensayo en un tubo de ensayo.
 - c) Se pipetea directamente 100 µl de la muestra del hisopo en el mismo tubo de ensayo y se mezclan bien con vórtex o por cualquier otro medio.
 - d) Se retira la tira reactiva de la bolsa de aluminio y se coloca inmediatamente en el tubo de ensayo.
 - e) Se lee el resultado de la prueba después de 10 ~ 15 minutos, las muestras no deben interpretarse pasados 20 minutos.
 - f) Cada tira utilizada en este ensayo contiene una línea de control que indica que el ensayo está funcionando.
 - g) Con cada lote de muestra, procese siempre una muestra negativa confirmada por RT-PCR y una muestra positiva también confirmada por RT-PCR para que se puedan utilizar como controles negativo y positivo, respectivamente.

La presencia de la línea púrpura tanto en la posición de control (C) como en la de muestra problema (T) aporta la determinación del umbral. La muestra problema es positiva cuando aparecen dos líneas (línea C y línea T) y negativa cuando solo aparece la línea C. Las líneas consisten en la reacción inmunitaria entre el conjugado de oro y los analitos diana. El conjugado de oro consta de oro coloidal y anticuerpo contra MERS-CoV.

- ii) Interpretación de los resultados
 - a) Resultado negativo: Solo aparece una banda de control ("C").
 - b) Resultado positivo: Aparecen la banda problema ("T") y la banda de control ("C").
 - c) No válido: el control ("C") no aparece. Si la banda de control no está visible dentro de la ventana de resultados después de realizar la prueba, el resultado se considera inválido. Se recomienda que la muestra se vuelva a analizar con un nuevo kit de prueba.

- iii) Control de calidad

Cada tira utilizada en este ensayo contiene una línea de control que indica que el ensayo está funcionando. Con cada lote de muestra, procese siempre una muestra negativa confirmada por RT-PCR y una muestra positiva confirmada también por RT-PCR para que puedan utilizarse como controles negativo y positivo, respectivamente. Las TIC pueden ser negativas cuando no hay suficiente virus en la muestra.

2. Pruebas serológicas

Existen varios ensayos para la detección de anticuerpos contra MERS-CoV en dromedarios. Actualmente, la técnica más utilizada es el enzimoimmunoanálisis (ELISA) para la detección de IgG. Las pruebas de neutralización de virus también se han utilizado para detectar anticuerpos contra MERS-CoV en el suero de dromedarios (Hemida *et al.*, 2013; Meyer *et al.*, 2014; Reusken *et al.*, 2013a; 2013b). Las muestras obtenidas de animales para la prueba de anticuerpos pueden contener virus vivo y se deben implementar los pasos de inactivación apropiados.

2.1. Enzimoimmunoanálisis

Se han desarrollado varios ELISA y existe uno a la venta. El ELISA es una prueba fiable y sensible para detectar anticuerpos contra MERS-CoV. El uso de la subunidad S1 antigénicamente divergente de la proteína puntiaguda de MERS-CoV permite la detección de anticuerpos específicos contra MERS-CoV. No se han descrito ELISA de IgM que permitan el diagnóstico de infecciones recientes.

2.1.1. ELISA de IgG indirecto

- i) Procedimiento analítico
 - a) Se recubre cada pocillo de la placa ELISA de 96 pocillos con 100 µl de proteína S1 recombinante a razón de 1 µg/ml en PBS, se sella la placa y se deja durante la noche a 4°C.
 - b) Se lavan las placas tres veces con aproximadamente 300 µl de PBS por pocillo.
 - c) Se bloquean las placas con 200 µl de tampón de bloqueo que contenga un 1% de BSA/0,5% de Tween20 en PBS durante 1 hora a 37°C.
 - d) Se diluyen tanto el control (positivo y negativo) como los sueros problema a 1/100 en tampón de bloqueo.
 - e) Se añaden 100 µl de los sueros diluidos a los pocillos designados por duplicado.
 - f) Se incuban las placas durante 1 hora a 37°C. Debe evitarse que se sequen colocando las placas en una cámara húmeda.
 - g) Después del paso de incubación, se lavan las placas de ELISA con tampón de lavado (Tween20 al 0,05% en PBS) tres veces con 300 µl de tampón de lavado por pocillo.
 - h) A continuación, se incuban los pocillos con 100 µl de un conjugado de anticuerpo anti-biotina de llama generado en cabra (diluido a 1:1000 en tampón de bloqueo).
 - j) Se incuban durante 1 hora a 37°C.
 - j) Las placas se lavan cuatro veces con PBS.
 - k) Se añaden 100 µl de sustrato cromogénico TMB (tetrametilbencidina) listo para usar a cada pocillo y se dejan reposar las placas a temperatura ambiente durante unos minutos, evitando la exposición a la luz directa.
 - l) Se detiene la reacción con 100 µl de solución de parada y se leen las placas con el lector de placas de ELISA a 450 nm.

2.2. Pruebas de neutralización de MERS-CoV

Las pruebas de neutralización son las pruebas serológicas de diagnóstico más específicas, pero estas pruebas solo se pueden realizar con virus vivos y no se recomienda su uso fuera de laboratorios sin las instalaciones de bioseguridad adecuadas. Existen ensayos de neutralización alternativos que no requieren manipulación de MERS-CoV altamente virulentos utilizando virus pseudotipificados.

2.2.1. Prueba de neutralización con pseudopartículas

- i) Producción de pseudopartículas puntiagudas del coronavirus humano (HCoV)-MERS
La pseudopartícula utilizada en esta prueba expresa la proteína puntiaguda de longitud completa de MERS-CoV. Está destinada a ser utilizada para el cribado de muestras de suero que pueden neutralizar el virus MERS-CoV. A diferencia de la prueba de neutralización de virus estándar para MERS-CoV, en este ensayo no hay MERS-CoV infeccioso y todo el trabajo se puede realizar de forma segura en entornos estándar de

nivel 2 de bioseguridad. Se dispone de los plásmidos (pNL Luc-E-R- y pcDNA-S) necesarios para fabricar las pseudopartículas y pueden adquirirse previo pedido (Perera *et al.*, 2013)

- ii) Preparación de las pseudopartículas
 - a) Se tripsiniza un matraz de células 293T humanas (70–80% de confluencia, en un matraz de 75 cm²).
 - b) Se resuspenden las células tripsinizadas con 10 ml de medio completo DMEM (DMEM + piruvato con 10% de FBS (suero fetal bovino), HEPES 10 mM (N-2-hidroxietilpiperazina, ácido N-2-etanosulfónico), 5% de Pen/Strep)
 - c) Se recolectan las células suspendidas, y a continuación se centrifugan (450 **g** durante 5 minutos).
 - d) Se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células con medio completo DMEM nuevo.
 - e) Se cuentan las células usando un hemocitómetro.
 - f) Se ajusta la densidad celular a 5×10^5 por ml con medio completo DMEM.
 - g) Se transfieren 5×10^6 células a una placa de 10 cm² y se incuba el cultivo celular recién preparado en una incubadora de CO₂ durante la noche. Debe garantizarse que las células estén distribuidas uniformemente en la placa antes de la incubación.
 - h) El día de la transfección, se prepara una mezcla de solución agregando 15 µg de pNL Luc-E-R- y 15 µg de pcDNA-S a 350 µl de agua destilada estéril. Se agregan 56 µl de CaCl₂ 2 M a la mezcla y se completa la mezcla hasta 450 µl con agua destilada estéril. Se añaden lentamente gota a gota 450 µl de solución salina tamponada de HEPES 2x a la mezcla de ADN diluido. Se somete a vórtex brevemente la mezcla de la solución y se incuba a temperatura ambiente durante 2 minutos.
 - i) Se distribuye uniformemente la solución de ADN diluida gota a gota en la placa de 10 cm² y se mezcla la solución moviendo la placa de un lado a otro varias veces.
 - j) Se incuban las células transfectadas en una incubadora de CO₂ a 37°C durante 16–18 horas.
 - k) Se reemplaza el medio con medio completo DMEM sin alterar la monocapa. Se incuban las células tratadas durante 2 días más.
 - l) Se recolecta el sobrenadante el día 3 después de la transfección. Se centrifuga el sobrenadante a 450 **g** durante 5 minutos. Se filtra el sobrenadante centrifugado con un filtro estéril de 0,45 µm.
 - m) Se preparan alícuotas del filtrado y se conservan a –80°C hasta su uso.
- iii) Titulación de las pseudopartículas
 - a) Se siembran 1×10^4 células Vero en un pocillo (formato de placa de 96 pocillos) siguiendo un protocolo similar al descrito anteriormente. Se cultivan las células en una incubadora de CO₂ a 37°C durante la noche.
 - b) Se prepara una solución de pseudopartículas diluida dos veces (rango de factores de dilución: 1 a 2048) mezclando las pseudopartículas con medio de cultivo de virus (DMEM + piruvato con FBS al 2%, HEPES 10 mM, Pen/Strep al 5%) inmediatamente antes de la infección. 200 µl por cada concentración estudiada son suficientes para realizar la prueba por triplicado.
 - c) Se recuperan las células cultivadas, se desecha el medio de cultivo y se agregan 50 µl de medio de cultivo de virus a cada pocillo.
 - d) Se transfieren 50 µl de la solución de pseudopartículas preparada a los pocillos correspondientes de la placa. Se incuban las células tratadas en una incubadora de CO₂ a 37°C durante la noche.
 - e) Se añaden 100 µl de medio de cultivo de virus a cada pocillo 24 horas después de la infección y se incuban las células durante otras 48 horas.
 - f) A las 72 horas posteriores a la infección, se comprueba si hay la actividad luciferasa en las células infectadas utilizando un kit comercial de ensayo de luciferasa. La concentración de trabajo final utilizada para los ensayos de neutralización de

pseudopartículas es la concentración más diluida que tiene una actividad luciferasa máxima en este ensayo de titulación.

- iv) Prueba de neutralización de pseudopartículas
 - a) Se preparan las células Vero en un formato de placa de 96 pocillos el día antes de la infección como se ha descrito anteriormente.
 - b) Se agregan 16 µl de suero tratado térmicamente (56°C, 30 minutos) a 144 µl de medio de cultivo de virus (DMEM + piruvato, 2% FBS, 10 mM HEPES, 5% Pen/Strep); después se mezcla el suero diluido con 160 µl de pseudopartículas diluidas a la concentración predeterminada (véase arriba). Se mantiene la mezcla sobre hielo durante 60 minutos. Se incluyen los controles positivo y negativo apropiados para cada ejecución.
 - c) Se recuperan las células Vero cultivadas, se desecha el medio de cultivo y se transfieren 100 µl de pseudopartículas incubadas a los pocillos correspondientes por triplicado. Se incuban las células tratadas en una incubadora de CO₂ a 37°C durante 24 horas.
 - d) Se añaden 100 µl de medio de cultivo de virus a cada pocillo 24 horas después de la infección y se incuba el cultivo a 37°C durante otras 48 horas.
 - e) A las 72 horas posteriores a la infección, se comprueba si hay actividad luciferasa en las células infectadas utilizando un kit comercial de ensayo de luciferasa. Se utilizan datos de controles negativos para restar el valor de fondo. Los datos que dan los controles positivos representan una actividad luciferasa del 100%. El valor de corte del ensayo es el 90% de la inhibición de la actividad luciferasa promedio obtenida con los controles positivos.
 - f) Este ensayo determina si hay anticuerpos neutralizantes específicos de MERS-CoV utilizando muestras de suero diluidas 20 veces. Los títulos de anticuerpos neutralizantes de las muestras positivas se pueden determinar de manera similar utilizando sueros diluidos en serie dos veces en la prueba (dilución inicial: 20x).

2.2.2. Prueba de neutralización por reducción de placas

La prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT) se puede utilizar para determinar la presencia de anticuerpos en animales infectados de forma natural y en animales vacunados. La prueba es muy específica y se puede utilizar para analizar suero de cualquier especie. Por lo general, las PRNT80 (es decir, con una reducción del 80%) o PRNT90 realizadas en un sistema de cultivo celular se aceptan como sistema analítico estándar para la determinación cuantitativa de la actividad de anticuerpos neutralizantes en muestras de suero. La siguiente técnica utiliza un formato de 96 pocillos.

- i) Procedimiento analítico
 - a) Las muestras se inactivan primero a 56°C durante 30 minutos.
 - b) Se preparan 50 µl de diluciones seriadas a la mitad del suero inactivado por calor en medio RPMI1640 suplementado con penicilina de clemizol (penicilina G), estreptomycin y FBS al 1% (medio de cultivo al 1%) utilizando placas de fondo redondo de 96 pocillos. La dilución inicial debe ser 1/10 e incluir sueros control positivo y negativo comprobados.
 - c) Se diluye MERS-CoV en medio de cultivo al 1% hasta una dilución de 10000 dosis infecciosas de MERS-CoV en cultivo tisular por ml (DICT50/ml). Se agregan 50 µl de esta suspensión a los pocillos.
 - d) Se incuba durante 60 minutos a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.
 - e) Se inocula en células Huh-7 que se hayan cultivado en placas de 96 pocillos de fondo plano.
 - f) Se lava con solución salina tamponada con fosfato y se agregan 100 µl de medio de cultivo al 1%. Se incuba durante 8 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.

- g) A continuación, las células se fijan con formalina al 3,7% durante 15 minutos a 20°C. Después de retirar las placas de formalina, se sumergen en etanol al 70% y se mantienen durante la noche a 4°C.
- h) Las células se tiñen usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína N de MERS-CoV u otro antisuero específico contra MERS-CoV. Posteriormente, se aplica un anticuerpo secundario anti-IgG1 de ratón generado en cabra y marcado con peroxidasa, u otro anticuerpo adecuado. La señal puede aparecer utilizando un sustrato TMB formador de precipitados. El número de células infectadas por pocillo se cuenta utilizando un microscopio invertido o un analizador de imágenes.
- i) El título de neutralización de cada muestra de suero se determina como el recíproco de la dilución más alta, el cual da lugar a una reducción de al menos un 80 o 90% en el número de células infectadas. Un título ≥ 20 se considera positivo.

2.2.3. Prueba de neutralización del virus

- i) Procedimiento analítico
 - a) Las muestras se inactivan primero a 56°C durante 30 minutos.
 - b) Se preparan 50 μ l de diluciones seriadas a la mitad de suero inactivado por calor en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) suplementado con penicilina de clemizol (penicilina G), estreptomycin y FBS al 1% (medio de cultivo al 1%) usando una placa de 96 pocillos de fondo redondeado. La dilución inicial debe ser 1/10 e incluir sueros control positivo y negativo comprobados.
 - c) Se diluye el MERS-CoV en medio de cultivo al 1% hasta una dilución de 2000 dosis infecciosas de MERS-CoV en cultivo tisular por ml (DICT50/ml). Se agregan 50 μ l de esta suspensión a los pocillos.
 - d) Se incuba durante 60 minutos a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.
 - e) Se inocula la suspensión de virus en las células Vero cultivadas en placas de 96 pocillos de fondo plano en medio de cultivo al 10%.
 - f) Se incuba durante 60 minutos a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.
 - g) Se lava con solución salina tamponada con fosfato y se agregan 200 μ l de medio de cultivo al 1%. Se incuba durante 5 días a 37°C.
 - h) Se determinan los títulos a punto final.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

Hasta ahora, de entre los candidatos a vacuna existentes, solo tres se han comprobado en dromedarios: pVaxA, una vacuna de AND; una vacuna de subunidad de proteína puntiaguda de MERS-rCoV adyuvantada; y una vacuna de MVA, que es una vacuna que contiene vector vírico (Adney *et al.*, 2019; Haagmans *et al.*, 2016; Muthumani *et al.*, 2015).

BIBLIOGRAFÍA

ADNEY D.R., DOREMALEN, N.V., BROWN V.R., BUSHMAKER T., SCOTT D., WIT E., BOWEN R.A. & MUNSTER V.J. (2014). Replication and shedding of MERS-CoV in upper respiratory tract of inoculated dromedary camels. *Emerg. Infect. Dis.*, **20**, 1999–2005.

ADNEY D.R., WANG L., VAN DOREMALEN N., SHI W, ZHANG Y., KONG W.P., MILLER M.R., BUSHMAKER T., SCOTT D., DE WIT E., MODJARRAD K., PETROVSKY N., GRAHAM B.S., BOWEN R.A. & MUNSTER V.J. (2019). Efficacy of an Adjuvanted Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein Vaccine in Dromedary Camels and Alpacas. *Viruses*, **11**, 212, doi:10.3390/v11030212.

AGUANO R., ELIDRISSI A., ELKHOLY A.A., EMBAREK P.B., GARDNER E., GRANT R., MAHROUS H., MALIK M.R., PAVADE G., VONDOBSCHUETZ S., WIERSMA L. & VAN KERKHOVE M.D. (2018). MERS: Progress on the global response, remaining challenges and the way forward. *Antiviral Res.*, **159**, 35–44.

CHAN J.F.W., LAU S.K.P., TO K.K.W., CHENG V.C.C., WOO P.C.Y. & YUEN K.Y. (2015). Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, **28**, 465–522.

CHU D.K., POON L.L., GOMAA M.M., SHEHATA M.M., PERERA R.A., ABU ZEID D., EL RIFAY A.S., SIU L.Y., GUAN Y., WEBBY R.J., ALI M.A., PEIRIS M. & KAYALI G. (2014). MERS coronaviruses in dromedary camels, Egypt. *Emerg. Infect. Dis.*, **20**, 1049–53.

CHU D.K.W., HUI K.P.Y., PERERA R.A.P.M., MIGUEL E., NIEMEYER D., ZHAO J., CHANNAPPANAVAR R., DUDAS G., OLADIPO J.O., TRAORÉ A., FASSI-FIHRI O., ALI A., DEMISSIÉ G.F., MUTH D., CHAN M.C.W., NICHOLLS J.M., MEYERHOLZ D.K., KURANGA S.A., MAMO G., ZHOU Z., SO R.T.Y., HEMIDA M.G., WEBBY R.J., ROGER F., RAMBAUT A., POON L.L.M., PERLMAN S., DROSTEN C., CHEVALIER V. & PEIRIS M. (2018). MERS coronaviruses from camels in Africa exhibit region-dependent genetic diversity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **115**, 3144–3149. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718769115>

CORMAN V.M., ECKERLE I., BLEICKER T., ZAKI A., LANDT O., ESCHBACH-BLUDAU M., VAN BOHEEMEN S., GOPAL R., BALLHAUSE M., BESTEBROER T.M., MUTH D., MÜLLER M.A., DREXLER J.F., ZAMBON M., OSTERHAUS A.D., FOUCHIER R.M. & DROSTEN C. (2012a). Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro. Surveill.*, **17**, 1-6.

CORMAN V.M., MÜLLER M.A., COSTABEL U., TIMM J., BINGER T., MEYER B., KREHER P., LATTWEIN E., ESCHBACH-BLUDAU M., NITSCHKE A., BLEICKER T., LANDT O., SCHWEIGER B., DREXLER J.F., OSTERHAUS A.D., HAAGMANS B.L., DITTMER U., BONIN F., WOLFF T. & DROSTEN C. (2012b). Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Euro. Surveill.*, **17**, pii=20334. <https://doi.org/10.2807/ese.17.49.20334-en>.

DAVID D., ROTENBERG D., KHINICH E., ERSTER O., BARDENSTEIN S., STRATEN M., OKBA N.M.A., RAJ S.V., HAAGMANS B.L., MICULITZKI M. & DAVIDSON I. (2018). Middle East respiratory syndrome coronavirus specific antibodies in naturally exposed Israeli llamas, alpacas and camels. *One Health*, **5**, 65–68

HAAGMANS B.L., AL DHAHRY S.H., REUSKEN C.B., RAJ V.S., GALIANO M., MYERS R., GODEKE G.J., JONGES M., FARAG E., DIAB A., GHOBASHY H., ALHAJRI F., AL-THANI M., AL-MARRI S.A., AL ROMAIHI H.E., AL KHAL A., ALISON BIRMINGHAM A., OSTERHAUS A.D.M.E., ALHAJRI M.M. & KOOPMANS M.P.G. (2014). Middle East respiratory syndrome coronavirus in dromedary camels: an outbreak investigation. *Lancet Infect. Dis.*, **14**, 40–145.

HAAGMANS B.L., VAN DEN BRAND J.M., RAJ V.S., VOLZ A., WOHLSEIN P., SMITS S.L., SCHIPPER D., BESTEBROER T.M., OKBA N., FUX R., BENSALD A., SOLANES FOZ D., KUIKEN T., BAUMGÄRTNER W., SEGALÉS J., SUTTER G. & OSTERHAUS A.D. (2016). An orthopoxvirus-based vaccine reduces virus excretion after MERS-CoV infection in dromedary camels. *Science*, **351**, 77–81.

HEMIDA M.G., CHU D.K.W., POON L.L.M., PERERA R.A.P.M., ALHAMMADI M.A., NG H.Y., SIU L.Y., GUAN Y., ALNAEEM A. & PEIRIS M. (2014). MERS coronavirus in dromedary camel herd, Saudi Arabia. *Emerg. Infect. Dis.*, **20**, 1231–1234.

HEMIDA M.G., PERERA R.A., WANG P., ALHAMMADI M.A., SIU L.Y., LI M., POON L.L., SAIF L., ALNAEEM A. & PEIRIS M. (2013). Middle East Respiratory Syndrome (MERS) coronavirus seroprevalence in domestic livestock in Saudi Arabia, 2010 to 2013. *Euro. Surveill.*, **18**, 20659.

HUI D.S., AZHAR E.I., KIM Y.J., MEMISH Z.A., OH M.D. & ZUMLA A. (2018). Middle East respiratory syndrome coronavirus: risk factors and determinants of primary, household, and nosocomial transmission. *Lancet Infect. Dis.*, **18**, e217–e227.

KANDEIL A., GOMAA M., SHEHATA M., EL-TAWEEL A., KAYED A.E., ABIADH A., JRIJER J., MOATASIM Y., KUTKAT O., BAGATO O., MAHMOUD S., MOSTAFA A., EL-SHESHENY R., PERERA R.A., KO R.L.W., HASSAN N., ELSOKARY B., ALLAL L., SAAD A., SOBHY H., MCKENZIE P.P., WEBBY R.J., PEIRIS M., ALI M.A. & KAYALI G. (2019). Middle East respiratory syndrome coronavirus infection in non-camelid domestic mammals. *Emerg. Microbes Infect.*, **8**, 103–108.

KHALAFALLA A.I., LU X., AL MUBARAK A.I.A., DALAB A.H.S., AL BUSADAH K.A.S. & ERDMAN D.D. (2015). MERS-CoV in upper respiratory tract and lungs of dromedary camels, Saudi Arabia, 2013–2014. *Emerg. Infect. Dis.*, **21**, 1153–1158.

LAU S.K.P., LI K.S.M., LUK H.K.H., HE Z., TENG J.L.L., YUEN K.-Y., WERNERY U. & WOO P.C.Y. (2020). Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Antibodies in Bactrian and Hybrid Camels from Dubai. *mSphere*, **5**, e00898-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00898-19>.

MACLACHLAN N.J., NUNAMAKER R.A., KATZ J.B., SAWYER M.M., AKITA G.Y., OSBURN B.I. & TABERCHNICK W.J. (1994). Detection of bluetongue virus in the blood of inoculated calves: comparison of virus isolation, PCR assay, and in vitro feeding of *Culicoides variipennis*. *Arch. Virol.*, **136**, 1–8.

MEYER B., JUHASZ J., BARUA R., GUPTA A.D., HAKIMUDDIN F., CORMAN V.M., MÜLLER M.A., WERNERY U., DROSTEN C. & NAGY P. (2016). Time course of MERS-CoV infection and immunity in dromedary camels. *Emerg. Infect. Dis.*, **22**, 2171–2173.

MEYER B., MÜLLER M.A., CORMAN V.M., REUSKEN C.B., RITZ D., GODEKE G.J., LATTWEIN E., KALLIES S., SIEMENS A., VAN BEEK J., DREXLER J.F., MUTH D., BOSCH B.J., WERNERY U., KOOPMANS M.P., WERNERY R. & DROSTEN C. (2014). Antibodies against MERS coronavirus in dromedary camels, United Arab Emirates, 2003 and 2013. *Emerg. Infect. Dis.*, **20**, 552-9.

MOHAMED D.H., ALHETHEEL A.F., MOHAMUD H.S., ALDOSARI K., ALZAMIL F.A. & SOMLY A.M. (2017). Clinical validation of 3 commercial real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assays for the detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus from upper respiratory tract specimens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **4**, 320–324.

MUTHUMANI K., FALZARANO D., REUSCHEL E.L., TINGEY C., FLINGAI S., VILLARREAL D.O., WISE M., PATEL A., IZMIRLY A., ALJUAID A., SELIGA A.M., SOULE G., MORROW M., KRAYNYAK K.A., KHAN A.S., SCOTT D.P., FELDMANN F., LACASSE R., MEADE-WHITE K., OKUMURA A., UGEN K.E., SARDESAI N.Y., KIM J.J., KOBINGER G., FELDMANN H., WEINER D.B. (2015). A synthetic consensus anti-spike protein DNA vaccine induces protective immunity against Middle East respiratory syndrome coronavirus in nonhuman primates. *Sci. Transl. Med.*, **7**, doi: 10.1126/scitranslmed.aac7462.

PERERA R.A., WANG P., GOMAA M.R., EL-SHESHENY R., KANDEIL A., BAGATO O., SIU L.Y., SHEHATA M.M., KAYED A.S., MOATASIM Y., LI M., POON L.L., GUAN Y., WEBBY R.J., ALI M.A., PEIRIS J.S. & Kayali G. (2013). Seroepidemiology for MERS coronavirus using microneutralisation and pseudoparticle virus neutralisation assays reveal a high prevalence of antibody in dromedary camels in Egypt, June 2013. *Euro. Surveill.*, **18**(36):pii=20574.

REUSKEN C.B., ABABNEH M., RAJ V.S., MEYER B., ELJARAH A., ABUTARBUSH S., GODEKE G.J., BESTEBROER T.M., ZUTT I., MULLER M.A., BOSCH B.J., ROTTIER P.J., OSTERHAUS A.D., DROSTEN C., HAAGMANS B.L. & KOOPMANS M.P. (2013a). Middle East Respiratory Syndrome coronavirus (MERS-CoV) serology in major livestock species in an affected region in Jordan, June to September 2013. *Euro. Surveill.*, **18**, 20662.

REUSKEN C.B., SCHILP C., RAJ V., DE BRUIN E., KOHL R., FARAG E., HAAGMANS B.L., AL-ROMAIHI H., LE GRANGE F., BOSCH B.J. & KOOPMANS M.P.G. (2016). MERS-CoV Infection of Alpaca in a Region Where MERS-CoV is Endemic. *Emerg. Infect. Dis.*, **22**, 1129–1131.

REUSKEN C.B., HAAGMANS B.L., MÜLLER M.A., GUTIERREZ C., GODEKE G.J., MEYER B., MUTH D., RAJ V.S., SMITS-DE VRIES L., CORMAN V.M., DREXLER J.F., SMITS S.L., EL TAHIR Y.E., DE SOUSA R., VAN BEEK J., NOWOTNY N., VAN MAANEN K., HIDALGO-HERMOSO E., BOSCH B.J., ROTTIER P., OSTERHAUS A., GORTÁZAR-SCHMIDT C., DROSTEN C. & KOOPMANS M.P. (2013b). Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. *Lancet Infect. Dis.*, **13**, 859–866.

SIKKEMA R.S., FARAG E.A.B.A., ISLAM M., ATTA M., REUSKEN C.B.E.M., AL-HAJRI M.M. & KOOPMANS M.P.G. (2019). Global status of Middle East respiratory syndrome coronavirus in dromedary camels: a systematic review. *Epidemiol. Infect.*, **147**, 1–13.

SONG D., HA G., SERHAN W., ELTAHIR Y., YUSOF M., HASHEM F., ELSAYED E., MARZOUG B., ABDELAZIM A. & AL MUHAIRI. (2015). Development and validation of a rapid immunochromatographic assay for detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus antigen in dromedary camels. *J. Clin. Microbiol.*, **53**, 1178–1182.

WERNERY U., LAU SK. & WOO P.C. (2017). Middle East respiratory syndrome (MERS) coronavirus and dromedaries. *Vet. J.*, **220**, 75–79.

WOO P.C., LAU S.K., FAN R.Y., LAU C.C., WONG E.Y., JOSEPH S., TSANG A.K., WERNERY R., YIP C.C., TSANG C.C., WERNERY U. & YUEN K.Y. (2016). Isolation and Characterization of Dromedary Camel Coronavirus UAE-HKU23

from Dromedaries of the Middle East: Minimal Serological Cross-Reactivity between MERS Coronavirus and Dromedary Camel Coronavirus UAE-HKU23. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, pii: E691. doi: 10.3390/ijms17050691.

ZAKI A.M., VAN BOHEEMEN S., BESTEBROER T.M., OSTERHAUS A.D. & FOUCHIER R. A. (2012) Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *New Engl. J. Med.*, **367**, 1814–1820.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) (puede consultarse en la página web de la OIE: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>).

Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para el MERS

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2021.