CAPÍTULO 3.1.15.

ENFERMEDADES CAUSADAS POR LOS VIRUS NIPAH Y HENDRA

RESUMEN

El virus Hendra (VHe) y el virus Nipah (VNi) surgieron en la década de 1990 como causas de brotes de enfermedades zoonóticas. El primer brote notificado de VHe se produjo en Brisbane (Australia) en 1994. En este caso, el VHe causó una enfermedad respiratoria grave y la muerte de 13 caballos y un entrenador de caballos en un establo. El VNi apareció en la población humana entre septiembre de 1998 y abril de 1999 en Malasia como causa de una encefalitis aguda mortal, tras propagarse principalmente como enfermedad respiratoria de etiología desconocida en la población porcina. El VHe ha causado la muerte de cuatro de siete personas infectadas en Australia, mientras que se ha informado de más de 600 casos de VNi en humanos, con más de 400 muertes, en Bangladesh, India, Malasia, Filipinas y Singapur. Los murciélagos frugívoros (zorros voladores) del género Pteropus *son huéspedes reservorios de ambos virus.*

La infección por VHe en caballos no tiene una presentación patognomónica. Los caballos pueden presentar signos respiratorios, neurológicos o clínicos inespecíficos. Los signos respiratorios incluyen taquipnea o secreción nasal espumosa. Los signos neurológicos incluyen ataxia, inclinación de la cabeza, movimientos en círculos, convulsiones, abatimiento o decúbito. Los signos inespecíficos incluyen fiebre alta, taquicardia, inapetencia o cólicos. La infección por VHe en caballos no es siempre mortal, ni parece ser altamente contagiosa entre caballos. Es necesario un contacto estrecho con orina, saliva o productos del parto de zorros voladores infectados para que se transmita de éstos a los caballos. Los caballos infectados en los pastos rara vez han transmitido el virus a otros caballos. La transmisión parece producirse más fácilmente en entornos cerrados, como establos y clínicas veterinarias, y está asociada al contacto con líquidos corporales de caballos infectados.

La infección porcina por el VNi es muy contagiosa que se caracteriza por fiebre con afectación respiratoria y, a veces, también neurológica, pero muchas infecciones son subclínicas. Algunos cerdos infectados presentan una inusual tos fuerte y seca. Se han notificado casos de aborto.

Actualmente, no se sabe si la susceptibilidad de los perros y los gatos es suficiente como para llegar a tener importancia epidemiológica.

La infección de los humanos se produce por contacto con animales, normalmente por un hospedador propagador, en lugar de producirse directamente por el hospedador reservorio: el VNi del cerdo y el VHe de los caballos. Sin embargo, las investigaciones de los brotes de VNi en humanos de Bangladesh han apuntado a la infección humana por murciélagos pterópidos sin hospedador intermediario/amplificador. Solo se ha observado la transmisión entre humanos en los brotes de VNi de Bangladesh y de la India.

El VHe y el VNi son miembros estrechamente relacionados del género Henipavirus, *que pertenece a la familia* Paramyxoviridae. *Existen dos genotipos de VNi, a saber, VNi -M (Malasia) y VNi -B (Bangladesh). La reciente caracterización genética del VNi-B a partir de casos de murciélagos y humanos en Bangladesh en 2012-2018 ha mostrado divergencia genética durante 1995, formando dos sublinajes: VNi-B1 y VNi-B2 (Rahman* et al.*, 2021). Se han reconocido dos genotipos del VHe, a saber, VHe-g1 y VHe-g2. El VHe y el VNi son agentes patógenos peligrosos para el ser humano. Todas las manipulaciones de laboratorio con cultivos vivos o material potencialmente infectado/contaminado deben realizarse en un nivel adecuado de bioseguridad y contención.*

Detección del agente: *Debido al potencial zoonótico y a las altas tasas de letalidad asociadas a estos virus, los laboratorios de diagnóstico pueden decidir, tras una evaluación exhaustiva del riesgo, utilizar técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en tiempo real para la detección del agente en lugar de intentar la propagación del virus infeccioso. Tanto el VHe como el VNi pueden propagarse en una amplia gama de cultivos celulares. Debe intentarse el aislamiento del virus a partir de muestras de campo, pero sólo en situaciones en las que pueda garantizarse la seguridad del operador. Los procedimientos de identificación incluyen RT-PCR, inmunotinción de células infectadas y neutralización con antisueros víricos específicos.*

El antígeno vírico se encuentra presente en el endotelio vascular y, en el caso de las infecciones porcinas por VNi, en el epitelio respiratorio. Para detectar los antígenos del VHe y del VNi mediante inmunohistoquímica (IHC), puede examinarse una gran variedad de tejidos fijados en formalina.

Pruebas serológicas: *Tras una evaluación del riesgo biológico, los laboratorios de diagnóstico pueden optar por evitar las pruebas serológicas en las que se utilizan virus vivos. Actualmente, los ELISA se utilizan como prueba de cribado, y la VN, como prueba de referencia y confirmativa. La capacidad de los anticuerpos anti-VHe y anti-VNi de neutralizar de forma cruzada a un nivel limitado hace que una única VN empleada con cualquiera de los virus no permite la identificación definitiva de la especificidad del anticuerpo detectado.*

Requisitos para las vacunas: *Existe una vacuna para el VHe registrada en Australia para su uso en caballos. Para el VNi, actualmente no se dispone de vacuna.*

A. INTRODUCCIÓN

El virus Hendra (VHe) y el virus Nipah (VNi) forman parte de la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, género *Henipavirus.* Tienen propiedades morfológicas y fisicoquímicas características de los paramixovirus. Son pleomórficos y tienen envoltura, y nucleocápsidas en espinapez. Los viriones miden 40–600 nm de diámetro. Las espículas de la glucoproteína y de la proteína de fusión protruyen a través de una envoltura lipídica. Tanto el VHe como el VNi tienen una genoma de ARN de polaridad negativa, monocatenario y no segmentado (18,2 kb), que consiste en seis genes que codifican seis proteínas estructurales principales, que son las siguientes: N (proteína de la nucleocápsida), P (fosfoproteína), M (proteína de la matriz), F (proteína de fusión), G (glucoproteína) y L (proteína grande).

El VHe y el VNi tienen lugar de forma natural como virus de murciélagos frugívoros, cuyo nombre común es "zorros voladores", y que son miembros del género *Pteropus*, familia *Pteropodidae.* Se han encontrado anticuerpos contra al VHe en las cuatro especies de *Pteropus* australianos, y su prevalencia varía a lo largo del tiempo. Hasta la fecha, todos los casos de VHe en caballos se han producido dentro del área de distribución geográfica de los murciélagos *Pteropus*, que se correlaciona con la costa este de Australia. Se han detectado anticuerpos contra el VNi o virus estrechamente relacionados en murciélagos pterópidos en gran parte de su área de distribución geográfica. El VHe-g1 se ha aislado en zorros voladores australianos (Halpin *et al*., 2000), y se ha detectado un nuevo genotipo del VHe (HeV-g2) en dos especies de zorros voladores de Australia (Wang *et al*., 2021). El VNi se ha aislado de zorros voladores en Malasia y Camboya (Chua *et al*., 2002; Reynes *et al*., 2005). En Ghana, un pequeño estudio mostró que el 39% de *Eidolon helvum*, un murciélago frugívoro no-pterópido, tenía anticuerpos contra el VNi (Hayman *et al*., 2008). También se obtuvieron secuencias similares a las de Henipavirus a partir de *Eidolon helvum* en Ghana (Hayman *et al*., 2008). La detección de anticuerpos y secuencias de henipavirus en murciélagos africanos sugiere que la gama de posibles infecciones por VNi puede ser más amplia de lo que se pensaba.

La enfermedad del VHe surgió en Brisbane, Australia, en septiembre de 1994, en un brote de una enfermedad respiratoria aguda que causó la muerte de 13 caballos y de un entrenador de caballos (Murray *et al.*, 1995). El virus se denominó inicialmente morbilivirus equino, pero los análisis genéticos posteriores indicaron que era lo suficientemente diferente como para pertenecer a su propio género. Desde 2006, se ha producido al menos un evento de propagación cada año, y en la mayoría de los casos solo ha afectado a un pequeño número de caballos. Una investigación retrospectiva aisló VHe-g2 de un caso equino de 2015 (Annand *et al*., 2022). Hasta la fecha, siete casos humanos han provocado cuatro muertes (tasa de letalidad del 57%). Los signos clínicos en humanos van desde una infección similar a la gripe hasta una neumonía o encefalitis graves que conducen a la muerte (Yuen *et al*., 2021). Todas las personas infectadas han tenido un contacto muy estrecho con líquidos corporales

infectados de caballos infectados al realizar procedimientos invasivos y/o no han llevado un equipo personal de protección total.

Los estudios retrospectivos de muestras histológicas de archivo indican que el VNi ha causado una baja mortalidad entre los cerdos de Malasia desde 1996, pero permaneció desconocido hasta 1999, año en el que surgió como agente causal de un brote de encefalitis en humanos que había comenzado en 1998 (Chua *et al.*, 2000; Nor *et al.*, 2000). A diferencia de la enfermedad respiratoria causada por el VHe en caballos, que con frecuencia era mortal, pero se caracterizaba por una escasa transmisibilidad en condiciones de campo, la enfermedad respiratoria causada por el VNi en cerdos era a menudo subclínica pero muy contagiosa en estos animales alojados de forma intensiva (Hooper *et a*l., 2001). Esto condujo a una rápida diseminación del virus a través de la cabaña porcina de Malasia, y las autoridades optaron por el sacrificio como principal medio para controlar la propagación (Nor *et al*., 2000). Se destruyeron más de un millón de cerdos, y aproximadamente el 40% de los humanos infectados, en su mayoría criadores de cerdos en Malasia y trabajadores de mataderos en Singapur que tuvieron contacto directo con cerdos vivos, murieron de encefalitis (Chua *et al*., 2000). Un pequeño número de gatos, perros y caballos también se infectaron en explotaciones porcinas infectadas durante ese brote (Hooper *et al*., 2001; Nor *et al*., 2000), pero las infecciones no fueron epidemiológicamente significativas.

En Bangladesh, se han producido brotes de la enfermedad del VNi en humanos casi todos los años desde 2003, con algunos brotes en Bengala Occidental, en la vecina India, y más recientemente en Kerala, en la costa occidental de la India (Arunkumar et al., 2019). El consumo de savia fresca de palmera datilera contaminada por saliva, orina o excrementos de murciélagos de la fruta se ha identificado como la vía probable de transmisión del reservorio de fauna salvaje a los seres humanos en los brotes de Bangladesh (Luby *et al*., 2006). En algunos brotes, ha habido transmisión entre personas. Como resultado de estos brotes en curso, se estima que en Malasia, Singapur, Bangladesh y la India se han producido más de 600 casos de VNi en humanos, con más de 400 muertes.

En 2014 se notificó en Filipinas un brote de casos humanos de VNi, con 9 muertes en 17 casos (Ching *et al.,* 2015). En este brote, los caballos enfermos infectados fueron sacrificados y consumidos por las personas que posteriormente se infectaron. Se sospechó una posterior transmisión entre humanos. También se vieron afectados perros y gatos.

El diagnóstico de la enfermedad causada por henipavirus se realiza principalmente mediante la detección del ARN vírico en muestras clínicas o postmortem, y el aislamiento del virus o la demostración del antígeno vírico en muestras de tejido (Daniels *et al*., 2001). La detección de anticuerpos específicos también puede ser útil, sobre todo en cerdos, donde la infección por VNi puede pasar desapercibida. La identificación de anticuerpos contra el VHe en caballos es menos útil debido a la alta tasa de letalidad de la infección en esta especie. Las infecciones humanas tanto por el VHe como por el VNi se han diagnosticado retrospectivamente mediante serología. La demostración de anticuerpos específicos contra el VHe o el VNi en animales domésticos o seres humanos tiene importancia diagnóstica debido a la infrecuencia de la infección y a la grave implicación zoonótica de la transmisión de la infección.

El género de los henipavirus está en expansión y recientemente se han identificado nuevos virus. El virus del cedro se aisló de la orina de murciélagos *Pteropus* en Australia en 2009. Queda por ver si tiene la capacidad de propagarse a otras especies y, de ser así, causar enfermedad (Marsh *et al*., 2012). Se han detectado otros virus similares al henipa en animales salvajes mediante PCR y secuenciación, pero aún no se han aislado mediante técnicas tradicionales de aislamiento de virus (Wu *et al*., 2014). Se han aislado dos virus similares al henipa en musarañas de la República de Corea (Lee *et al*., 2021).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de henipavirus y su finalidad

Método	Finalidad					
	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[(a)]						
Aislamiento del virus	–	–	–	+++	–	–
RT-PCR y qRT-PCR	+	+	++	+++	+	–
IHC	–	–	–	++	–	–
IFA	–	–	–	++	–	–
Detección de respuesta inmunitaria[(b)]						
ELISA	+++	+++	+++	+	+++	+++
VN	+++	+++	+++	+	+++	+++
Pruebas con microesferas	+++	+++	+++	+	+++	+++

Clave: +++ = método recomendado para esta finalidad; ++ = método recomendado, pero tiene limitaciones;
+ = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para esta finalidad.
RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa
IHC = Inmunohistoquímica; IFA = Inmunofluorescencia indirecta; ELISA = enzimoinmunoanálisis;
VN = prueba de neutralización del virus.
[(a)]Se recomienda una combinación de métodos de identificación del agente aplicados a la misma muestra clínica.
[(b)]Los resultados positivos de los ELISA y basados en microesferas deben confirmarse mediante la VN, a menos que el ensayo esté validado a tal efecto.

1. Bioseguridad en el laboratorio

El VHe y el VNi son patógenos humanos peligrosos con una elevada tasa de letalidad y para los que no existe vacuna humana ni tratamiento antivírico eficaz. El transporte de muestras sospechosas a los laboratorios y todas las manipulaciones de laboratorio con cultivos víricos vivos (incluidas las pruebas serológicas, como la neutralización del virus (VN), en las que se utilicen virus vivos) o material potencialmente infectado/contaminado, como muestras de tejido o sangre, deben realizarse en un nivel apropiado de bioseguridad y contención, que vendrá determinado por 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 en las instalaciones para animales*). La seguridad de los trabajadores del laboratorio debe estar garantizada por la estrategia de gestión del riesgo biológico adoptada. Los laboratorios pueden adoptar diferentes estrategias de gestión del riesgo biológico en función de si analizan las muestras por PCR o si intentan propagar los agentes. Los métodos moleculares para la detección del agente son preferibles como pruebas de primera línea, ya que conllevan menos riesgos para el trabajador del laboratorio que el aislamiento del virus. Los laboratorios que no dispongan de instalaciones de contención adecuadas para la manipulación de muestras de casos sospechosos o para trabajar con virus infecciosos deben recurrir a los servicios de un laboratorio de referencia de la OMSA o de otro laboratorio especializado.

En particular, la propagación del virus debe llevarse a cabo en instalaciones de alta contención en condiciones estrictas que impidan la infección accidental del personal del laboratorio. Durante el aislamiento primario del virus a partir de muestras tomadas de casos sospechosos, debe apreciarse y reflejarse en los procedimientos que si se

desarrolla un efecto citopático (ECP) similar al de paramixovirus en cultivos infectados, el nivel de riesgo ha aumentado. Para que las directrices de bioseguridad sean las adecuadas, deberán hacer hincapié en las buenas prácticas de laboratorio, el nivel de contención, la clase de cabina de bioseguridad y el equipo de protección personal adecuado que se requiere. La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) o la detección por inmunofluorescencia del antígeno del henipavirus en células fijadas con acetona pueden utilizarse para identificar la cepa aislada como un henipavirus. El traslado de cultivos a laboratorios especializados debe seguir las normas de transporte especificadas en el Capítulo 1.1.3 *Transporte de muestras biológicas*.

2. Identificación del agente etiológico

2.1. Aislamiento y caracterización del virus

El aislamiento del virus facilita enormemente los procedimientos de identificación, pero solo puede llevarse a cabo en lugares en los que se pueda garantizar la seguridad del operario. El aislamiento es especialmente relevante en cualquier nuevo caso o brote, en concreto en países o zonas geográficas en las que no se haya documentado previamente la infección por el VHe o el VNi. Para identificar la presencia de genoma vírico en las muestras, pueden emplearse técnicas moleculares de detección que no requieran la propagación de virus vivo. Para que una especie salvaje sea considerada hospedadora natural de los virus debe dar positivo en pruebas serológicas, en PCR o en el aislamiento del virus después de la captura de estos animales.

2.1.1. Obtención y envío de las muestras

Se ha documentado el tipo de tejidos de los casos naturales o experimentales que pueden contener el virus (Daniels *et al*., 2001). En animales vivos, siempre se deben enviar hisopos (nasales u oro-naso-faríngeos), o bien muestras de sangre o suero de sangre cuya muestra se haya tomado en EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). También son útiles la orina, el encéfalo, los pulmones, los riñones y el bazo, que pueden obtenerse si se toman las precauciones de bioseguridad adecuadas durante la toma de muestras. En animales gestantes o en casos de aborto, deben incluirse el útero, la placenta y tejidos fetales, según proceda. Las muestras deben transportarse a 4°C si pueden llegar al laboratorio en un plazo de 48 horas; si el tiempo de transporte va a ser superior a 48 horas, las muestras deben enviarse congeladas en hielo seco o vapores de nitrógeno (≈ –78,5°C). Las muestras no deben conservarse a –20°C.

Las muestras para diagnóstico deben enviarse a los laboratorios designados en contenedores especialmente diseñados, conforme al Capítulo 1.1.3.

2.1.2. Aislamiento en cultivos celulares

Las consideraciones de bioseguridad revisten una importancia absoluta durante el aislamiento del henipavirus, como se destaca en la Sección 1 arriba.

El aislamiento del virus se ve facilitado por el hecho de que tanto el VHe como el VNi crecen rápidamente hasta alcanzar títulos altos en muchos cultivos celulares. Las células de riñón de mono verde africano (Vero CCL181) y de riñón de conejo (RK-13) son particularmente susceptibles. El VHe también se replica en encéfalo de ratones lactantes y en huevos embrionados de gallina, y los laboratorios que utilicen estos sistemas de aislamiento en la investigación de infecciones no diagnosticadas deben ser conscientes de esta posibilidad.

En el laboratorio que lleva a cabo el aislamiento del virus, los tejidos se manipulan en condiciones estériles y se generan suspensiones al 10% (p/v) triturando los tejidos en un sistema cerrado de homogeneización. Todos los procesos deben llevarse a cabo en condiciones apropiadas, según determine una evaluación exhaustiva de los riesgos para la bioseguridad. Los tubos utilizados deben tener juntas tóricas y una rosca exterior. Tras la clarificación del homogenado por centrifugación en un rotor con tapón de seguridad a 300 ***g*** durante 3-5 minutos y 4°C, se añade el sobrenadante a monocapas celulares confluentes.

Por lo general, aparece ECP en 3 días, pero se recomiendan dos pases de 5 días antes de juzgar fracasado el intento. Tras una baja multiplicidad de infección, el ECP se caracteriza por la formación de sincitios que pueden contener, al cabo de 24-48 horas, más de 60 o más núcleos.

Los sincitios formados por el VNi en monocapas de células Vero son significativamente mayores que los creados por el VHe en el mismo periodo de tiempo. Aunque la distribución de los núcleos en los sincitios inducidos por VNi al principio de la infección se asemeja a la inducida por el VHe, con núcleos agregados en el centro del sincitio, los núcleos de los sincitios maduros inducidos por el VNi se distribuyen alrededor de la célula gigante.

2.1.3. Métodos de identificación

i) Inmunotinción de células fijadas

La velocidad con la que el VHe y el VNi se replican y los altos niveles de antígeno vírico generados en las células infectadas hacen de la inmunofluorescencia un método útil para identificar de manera rápida la presencia de *Henipavirus*, empleando para ello antisuero anti-VNi o anti-VHe. La reactividad serológica cruzada entre el VHe y el VNi implica que un antisuero policlonal frente a uno de los dos virus o antisueros monoespecíficos contra proteínas individuales de cualquiera de ellos, no permitirán diferenciar entre ambos.

a*) *Procedimiento analítico

En condiciones de laboratorio adecuadas para gestionar los riesgos biológicos, se infectan monocapas de células Vero o RK-13 cultivadas en cubreobjetos de vidrio o en portaobjetos de cámara con el virus aislado, y se examinan las monocapas para determinar si hay sincitios tras incubarlas durante 24–48 horas a 37°C. Se recomienda probar una serie de diluciones del virus (sin diluir, 1/10, 1/100) porque los sincitios se observan más fácilmente después de la infección con una multiplicidad baja. Una vez detectados los sincicios visibles, las células infectadas se fijan por inmersión completa en un recipiente lleno de acetona o paraformaldehído. El recipiente se cierra herméticamente y se esteriliza la superficie antes de trasladarlo al laboratorio, donde los portaobjetos en los que se ha inactivado el virus pueden secarse al aire. El antígeno vírico se detecta utilizando antisuero anti-VHe o anti-VNi y procedimientos inmunofluorescentes estándar. Un rasgo característico de los sincitios inducidos por el henipavirus es la presencia de grandes estructuras poligonales que contienen antígeno vírico fluorescente.

ii) Microscopía inmunoelectrónica

Los altos títulos de VHe y VNi en células *in vitro* permiten su visualización en el medio de cultivo mediante microscopía electrónica de contraste negativo sin necesidad de una etapa de concentración por centrifugación. La detección de las interacciones virus-anticuerpo mediante microscopía inmunoelectrónica proporciona información valiosa sobre la estructura del virus y la reactividad antigénica, incluso durante el aislamiento primario del virus. Otras técnicas ultraestructurales, como el cultivo celular en rejilla (Hanna *et al*., 2006), en el que las células se cultivan, infectan y visualizan en rejillas de microscopio electrónico, y la identificación de virus replicantes y cuerpos de inclusión en cortes finos de cultivos celulares fijados e incrustados y tejidos infectados complementan la labor de diagnóstico. Están descritos los detalles de estas técnicas y su aplicación a la detección y el análisis de VHe y VNi (Hyatt *et al*., 2001).

2.2. Identificación del virus: diferenciación entre VHe y VNi

2.2.1. Inmunotinción comparativa

La posterior identificación de una cepa de henipavirus como VHe o VNi se realiza mediante una inmunotinción comparativa, como se describe en este apartado. Es necesario comparar la cepa con cultivos estándar tanto de VHe como de VNi, y, por lo tanto, todo el trabajo deberá desarrollarse con procedimientos que permitan controlar los riesgos biológicos. Se titulan los virus control y problema en placas de células Vero de 96 pocillos y, tras 18–24 horas, los focos de infección se detectan inmunológicamente en células fijadas con acetona empleando antisuero antivírico. Los títulos víricos se expresan como unidades formadoras de focos (UFF)/ml.

2.2.2. Prueba de la inmunofluorescencia

La cepa vírica que reacciona con antisueros anti-VHe y/o anti-VNi en una prueba de inmunofluorescencia se considera serológicamente idéntica al VHe o al VNi si muestra la misma sensibilidad a la neutralización mediante los antisueros anti-VHe y anti-VNi que los controles positivos del VHe o el VNi. El antisuero anti-VHe neutraliza al VHe a una dilución aproximadamente cuatro veces superior a la que neutraliza al VNi en el mismo grado. Por el contrario, el antisuero anti-VNi neutraliza al VNi unas cuatro veces más eficientemente que al VHe (Chua *et al*., 2000).

Recientemente se ha descrito una nueva versión de la prueba de neutralización diferencial, en la que se evita tener que utilizar el virus infeccioso, usándose en su lugar biosferas unidas a efrina-B2 (Bossart *et al*., 2007). Aunque aún debe validarse dicha prueba, esta puede ser una solución como herramienta de detección en los laboratorios que no dispongan de las instalaciones adecuadas para gestionar correctamente los riesgos biológicos de los cultivos de VHe y VNi.

2.2.3. Neutralización en placa de microtitulación

Para este procedimiento es necesario disponer de antisuero específico del VHe y del VNi, así como de virus de reserva. Los VHe y VNi de reserva y el henipavirus no identificado se diluyen, y se añaden réplicas de cada virus que contengan alrededor de 100 $DICT_{50}$ en 50 µl a los pocillos problema de una placa de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos. Los virus se mezclan con un volumen igual de medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) o con varias diluciones de antisuero contra el VHe o contra el VNi en EMEM. Se incuban las mezclas a 37°C durante 45 minutos y se añaden aproximadamente $2{,}4 \times 10^4$ células a cada pocillo hasta un volumen final aproximado de 200 µl. Después de 3 días a 37°C, la lectura de la prueba se realiza mediante un microscopio invertido y se puntúa el grado de ECP observado en cada pocillo. Los que contengan solo células o células y antisuero no mostrarán ECP. Por el contrario, los pocillos que contengan células y virus mostrarán sincitios y destrucción celular. Un pocillo positivo es aquél donde todas o una parte de las células de la monocapa forman grandes sincitios característicos de la infección por *Henipavirus*.

3. Métodos moleculares – detección de ácido nucleico

Se han secuenciado los genomas completos tanto del VHe como del VNi, y a medida que se dispone de más cepas, se depositan sus secuencias en Genbank. Para detectar el virus a menudo se emplea PCR, puesto que esta técnica tiene la ventaja, respecto a la bioseguridad, de no propagar el virus infeccioso vivo, y se ha validado en varios laboratorios. También es muy sensible y específica. Las muestras tomadas para la PCR deben inactivarse como parte del procedimiento de extracción de ARN antes de manipulaciones posteriores (PCR o secuenciación). El Laboratorio de Referencia de la OMSA ofrece consejo sobre los procedimientos a seguir[1].

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

Para la detección primaria de los henipavirus se utiliza la RT-PCR en tiempo real (véase la Tabla 2). Se han publicado diversos métodos analíticos y cebadores, como el ensayo del gen M del HeV-g2, que es ampliamente reactivo y detecta el VHe-g1 y el VHe -g2 (Wang *et al*., 2021), mientras que el ensayo del gen M del VHe-g1 es específico del Hendra-g1 (Smith *et al*., 2001). El ensayo del gen P del VHe detecta tanto Hendra como Nipah (Feldman *et al*., 2009).

1 Laboratorios de Referencia - OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal (woah.org).

Tabla 2. RT-PCR en tiempo real para la detección del VHe y del VNi

Ensayo	Oligo	Nombre	Secuencia del cebador (5' → 3')	Nombre de la sonda (5' → 3')
Gen VHe-g1_M (Smith *et al.*, 2001)	Directo	HeV M 5755F	CTT-CGA-CAA-AGA-CGG-AAC-CAA	
	Inverso	HeV M 5823R	CCA-GCT-CGT-CGG-ACA-AAA-TT	
	Sonda	HeV M 5778P	TGG-CAT-CTT-TCA-TGC-TCC-ATC-TCG-G	FAM-TAMRA
Gen M del VHe-g2 M* (Wang *et al.*, 2021)	Directo	HeV-g2-M-F	CTG-ATC-TAC-GTT-ACG-GCA-AAC-CTT	
	Inverso	HeV-g2-M-R	GG-CCC-GCT-TCA-CCA-TCT-CTT-AC	
	Sonda	HeV-g2-M-P	CAG-CAT-TGA-ATA-TTG-ACC-CGC-CAG-TCA	FAM-BHQ1
Gen N del VHe-g2 (Wang *et al.*, 2021)	Directo	HeV-g2-N-F	TGC-GAC-AGA-TCC-CAG-TAG-TAT-TAA-AT	
	Inverso	HeV-g2-N-R	GGC-AGC-TTA-TTC-GGC-AAA-AG	
	Sonda	HeV-g2-N-P	CTC-TGG-TGA-CGG-AAC-ACA-AAT-GCA-AAT-TTC	FAM-BHQ1
Gen P del VHe** (Feldman *et al.*, 2009)	Directo	HeV_P_2698F	ACA-TAC-AAC-TGG-ACC-CAR-TGG-TT	
	Inverso	HeV_P_2794R	CAC-CCT-CTC-TCA-GGG-CTT-GA	
	Sonda	HeV_P_2721P	ACA-GAC-GTT-GTA-TAC-CAT-G	FAM-MGBNFQ
Gen N del VHe*** (Feldman *et al.*, 2009)	Directo	HeV N119F	GAT-ATI-TTT-GAM-GAG-GCG-GCT-AGT-T	
	Inverso	HeV N260R	CCC-ATC-TCA-GTT-CTG-GGC-TAT-TAG	
	Sonda	HeV N198-220P	CTA-CTT-TGA-CTA-CTA-AGA-TAA-GA	FAM-MGBNFQ
Gen L del VNi **** (Wang, no publicado)	Directo	NiV_L_11908F	GGT-ATG-ART-GTT-TTT-TGT-TTT-GGT-TTA-C	
	Inverso	NiV_L_11962R	CGG-CTT-TTG-YGA-ATT-CTT-GA	
	Sonda	NiV_L_11937P	ATC-AAA-ACA-GAG-ATG-CGA-GC	FAM-MGBNFQ

*La prueba del gen M del VHe-g2 es ampliamente reactiva y detecta el VHe-g1 y el VHe-g2.
**El ensayo del gen P del VHe detecta tanto el VHe-g1 como el VHe-g2 y el NiV, pero con una sensibilidad ligeramente menor para el VHe-g2.
***El ensayo del gen N del VHe detecta el VHe-g1. Hay algunas discordancias con el VHe-g2 pero esto se supera cuando las cargas víricas son altas.
****La prueba del gen L del VNi detecta las dos cepas del VNi, es decir, VNi-M y VNi-B.

3.2. RT-PCR convencional y método de secuenciación de Sanger

Para la detección del VHe también pueden utilizarse dos PCR convencionales semi-anidadas, que tienen por objetivo los genes M y P. Estas dos pruebas se utilizan de manera complementaria para confirmar los resultados de las pruebas en tiempo real cuando estas últimas dan resultados inusuales o atípicos. También se utilizan para caracterizar los VHe detectados cuando van seguidas de una secuenciación de Sanger (di-deoxi) con los mismos cebadores (véase la Tabla 3).

Tabla 3. Cebadores utilizados para la PCR convencional y la secuenciación del VHe

Diana	Prueba	Tipo	Nombre	Secuencia del cebador (5'-3')	Producto de la PCR
Gen M del VHe* (Wang *et al.*, 2021)	PCR primaria	Directo	HeV M 5481F	GCC-CGC-TTC-ATC-ATC-TCT-T	300 pb
		Inverso	HeV M 5781R1	CCA-CTT-TGG-TTC-CGT-CTT-TG	
	PCR semi-anidada	Directo	HeV M 5481F	GCC-CGC-TTC-ATC-ATC-TCT-T	211 pb
		Inverso	HeV M 5691R2	TGG-CAT-CTT-TCA-TGC-TCC-ATC-TCG-G	
Gen P del VHe	PCR primaria	Directo	HeV P 4464F1	CAG-GAG-GTG-GCC-AAT-ACA-GT	335 pb
		Inverso	HeV P 4798R	GAC-TTG-GCA-CAA-CCC-AGA-TT	
	PCR semi-anidada	Directo	HeV P 4594F2	TCA-ACC-ATT-CAT-AAA-CCG-TCA-G	205 pb
		Inverso	HeV P 4798R	GAC-TTG-GCA-CAA-CCC-AGA-TT	

* La PCR convencional semianidada del gen M del VHe detecta tanto el VHe-g1 como el VHe-g2. La PCR convencional semianidada del gen P del VHe también detecta el VHe-g1 y el VHe-g2, pero con una sensibilidad mucho menor para el VHe-g2.

3.2.1. Condiciones de la RT-PCR para la detección del VHe

i) RT-PCR primaria

1× 48°C durante 30 minutos, 94°C durante 2 minutos

40× 95°C durante 30 segundos, 53°C durante 30 segundos, 68°C durante 45 segundos

1× 68°C durante 7 minutos

ii) PCR semi-anidada

1× 95°C durante 5 minutos

30× 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 45 segundos

1× 72°C durante 7 minutos

Se ha descrito una serie de PCR convencionales para el VNi, la mayoría de las cuales se dirigen al gen N. Para más detalles, véase Wacharapluesadee y Hemachudha (2007). Feldman *et al.*, (2009) describieron una PCR semi-anidada dirigida al gen L, que se describe a continuación. Este ensayo detecta el gen M del VNi y el gen B del VNi, y también detectará el VHe.

Tabla 4. Cebadores utilizados para la PCR convencional y la secuenciación de ambas cepas del NiV (Feldman et al., 2009)

Gen L del VNi	RT-PCR primaria	Forward	LFWD1	TGA GYA TGT ATA TGA AAG ATA AAG C	364 pb
		Reverse	LREV	TCA TCY TTA ACC ATC CCG TTC TC	
	PCR semi-anidada	Forward	LFWD2	ACC GAR CCA AGA TTG GT	266 pb
		Reverse	LREV	TCA TCY TTA ACC ATC CCG TTC TC	

3.2.2. Condiciones de la RT-PCR para la detección del gen L del VNi

i) RT-PCR primaria

1× 48°C durante 30 minutos

1× 95°C durante 15 minutos

30× 94°C durante 30 segundos, 42°C durante 30 segundos, 68°C durante 1 minuto

1× 68°C durante 5 minutos

ii) PCR semi-anidada

1× 95°C durante 15 minutos

30× 94°C durante 30 segundos, 46°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos

1× 72°C durante 5 minutos

Los laboratorios que deseen establecer métodos de detección moleculares deberán seguir los protocolos publicados o consultar el Laboratorio de Referencia de la OMSA.

3.3. Detección de antígeno de henipavirus en tejido fijado – inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una potente herramienta que permite visualizar el antígeno vírico dentro de las estructuras celulares y tisulares. El antígeno vírico de la nucleoproteína suele situarse dentro de partículas de tamaño y forma variable, en el interior del citoplasma. Dada la influencia que tiene la morfología en la interpretación, puede evaluarse la especificidad de la señal de color. Esta prueba se lleva a cabo en tejidos fijados en formalina, lo cual permite que el procedimiento se lleve a cabo de forma segura sin tener sin necesidad de aplicar condiciones de contención de microbiología.

El antígeno del henipavirus se replica en diversos tipos de células, como el endotelio, el músculo liso vascular, el parénquima pulmonar, los glomérulos renales, los cuerpos celulares de las neuronas, los tejidos linfoides y los tejidos conjuntivos (Hooper *et al.,* 2001; Marsh *et al*., 2011). El antígeno es particularmente denso en los sincitios y en los macrófagos de las lesiones. Por lo tanto, los tejidos adecuados para el diagnóstico de la infección por henipavirus son el pulmón, el cerebro, los ganglios linfáticos, el bazo y el riñón. En ausencia de estos tejidos, vale la pena examinar cualquier tipo de tejido, ya que el antígeno puede encontrarse en vasos sanguíneos ocasionales en todo el lecho vascular. A menos que se pueda llevar ropa de protección completa y se apliquen protocolos de desinfección adecuados, es más seguro extraer sólo pequeños trozos de tejido mediante muestreo realizado a través de incisiones muy pequeñas de los casos sospechosos. El tejido pulmonar y los ganglios linfáticos submandibulares son buenos tejidos para extraer de esta manera.

Los antisueros policlonales generados en conejo contra la nucleoproteína recombinante de henipavirus son muy fiables para su uso como anticuerpos primarios en inmunohistoquímica diagnóstica. La detección de antígenos de fosfoproteína también es adecuada para fines de diagnóstico, aunque la fosfoproteína tiende a expresarse menos que la nucleoproteína. Existen en el mercado diversos sistemas de detección secundaria que pueden utilizarse. A continuación, se presenta un ejemplo de procedimiento inmunohistoquímico en el que se utiliza un sistema de inmunoperoxidasa y un cromógeno AEC. Pueden utilizarse otros métodos, con ligeras variaciones del método según las enzimas y los cromógenos.

3.3.1. Procedimiento analítico

i) Procesar los tejidos fijados según los procedimientos histológicos habituales en bloques de parafina y preparar cortes en portaobjetos de vidrio. Preparar cortes de control positivo y de control negativo, si procede.

ii) Desparafinar los portaobjetos sumergiéndolos en tres baños consecutivos de xileno durante 3 minutos cada uno. Hidratar los cortes mediante dos cambios de etanol al 98-100%, un cambio de etanol al 70% y agua corriente del grifo para eliminar el alcohol residual.

iii) La recuperación del antígeno puede realizarse mediante calentamiento en un tampón de citrato (pH 9) durante 20 minutos a 97°C, o mediante digestión con proteinasa K durante 5 minutos.

iv) En este punto y entre cada paso sucesivo hasta después del paso vii, lavar los portaobjetos en tampón TRIS (pH 7,6) varias veces.

v) Bloquear el compuesto endógeno en esta etapa. Esto dependerá del sistema de detección utilizado, por ejemplo, si se utiliza un sistema de inmunoperoxidasa, la peroxidasa endógena debe bloquearse con H_2O_2 acuoso al 3% durante 10 minutos.

vi) Añadir el anticuerpo primario a una dilución previamente caracterizada durante 45 minutos.

vii) Añadir el conjugado de anticuerpo secundario. Existen muchos sistemas diferentes: los más sencillos y robustos constan de un solo paso. Consultar las instrucciones del fabricante del producto para su correcta utilización.

viii) Añadir el cromógeno (por ejemplo, 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), o 3,3' diamino-benzidina (DAB) durante 10 minutos. Consultar las instrucciones del producto para un uso correcto.

ix) Lavar con agua destilada para detener el desarrollo del color.

x) Aplicar tinción de contraste en hematoxilina durante 30 segundos a 3 minutos (según el tipo).

xi) Aclarar con agua del grifo. Añadir solución de Scott (bicarbonato sódico 0,04 M, sulfato magnésico 0,3 M), durante 1 minuto y lavar bien con agua corriente del grifo.

xii) Montar con un cubreobjetos utilizando medio de montaje acuoso.

xiii) El antígeno vírico puede visualizarse mediante la tinción marrón/roja, cuyo color depende del cromógeno utilizado.

Los métodos analíticos anteriores deben considerarse solo orientativos; cada parámetro de la prueba tendrá que optimizarse para el laboratorio en cuestión, ya que variarán según las condiciones específicas de cada laboratorio.

4. Pruebas serológicas

En los laboratorios que realizan pruebas serológicas, especialmente en situaciones de brote, se han adoptado varias estrategias para reducir el riesgo de exposición del personal de laboratorio al VHe y al VNi. Los sueros recibidos de un brote sospechoso de la enfermedad o de una región endémica deben irradiarse con rayos gamma (6 kilograys) o diluirse a 1/5 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenga 0,5% de polisorbato 20 y 0,5% de etoxilato de octilfenol, e inactivarse térmicamente a 56°C durante 30 minutos antes de la prueba. El proceso utilizado se basará en una evaluación del riesgo. Las muestras para las pruebas de vigilancia y las pruebas para la certificación del desplazamiento de animales pueden considerarse de menor riesgo biológico que las destinadas a la investigación de enfermedades durante un brote. En algunas circunstancias, la inactivación por calor puede adoptarse como precaución suficiente. Sin embargo, resulta útil disponer de un método normalizado para todas las muestras en la gestión de una prueba, en lugar de mantener múltiples métodos analíticos.

En Australia, la introducción de la vacunación equina contra el virus de Hendra ha afectado a la posible gama de finalidades de las pruebas que detectan anticuerpos contra la proteína G. La prueba puede utilizarse para detectar respuestas inmunitarias a la vacunación, y la detección de anticuerpos ya no indica necesariamente una infección previa en situaciones en las que puede haberse utilizado la vacuna. La posibilidad de vacunación debe tenerse en cuenta al interpretar las reacciones de las pruebas serológicas.

4.1. Pruebas de neutralización del virus

La prueba de neutralización del virus (VN) se acepta como estándar de referencia. La más utilizada es la prueba de microtitulación, que debe realizarse en condiciones adecuadas de gestión de riesgos biológicos. Los sueros problema se incuban con VHe o VNi en pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos antes de añadir células Vero. Los sueros se analizan a partir de una dilución 1/2, aunque esto puede dar lugar a problemas de citotoxicidad inducida por el suero. Cuando la calidad de la muestra es deficiente o los volúmenes de muestra son pequeños, como puede ser el caso de los sueros de zorro volador o de micromurciélago, puede ser adecuada una dilución inicial a 1/5. Los cultivos se leen el día 3, y los sueros que bloquean completamente el desarrollo del ECP se designan como positivos para anticuerpos. Si la citotoxicidad es un problema, sería necesario un sistema de placa inmunitaria (Crameri *et al*., 2002) porque las mezclas de virus/suero se eliminan de las monocapas de células Vero después del período de adsorción, limitando así su efecto tóxico. Los resultados de la prueba VN se consideran positivos si se observa neutralización del virus en cualquiera de las diluciones utilizadas en la prueba. Si se observan anticuerpos neutralizantes tanto para VHe como para VNi, el título más alto >cuádruple se considera positivo, y si los títulos difieren en una cantidad < cuádruple del suero, se considera positivo para un henipavirus no especificado. En el caso de los laboratorios que no disponen de instalaciones bioseguras adecuadas, se ha descrito una prueba de neutralización que utiliza un pseudotipo del virus de la estomatitis vesicular que expresa proteína verde fluorescente (Kaku *et al*., 2009).

4.2. Enzimoinmunoanálisis

Los antígenos de henipavirus derivados de cultivos tisulares para su uso en enzimoinmunoanálisis (ELISA) se irradian con 6 kilograys antes de su utilización, tratamiento que tiene un efecto insignificante sobre el título antigénico. En el ELISA indirecto desarrollado en respuesta al brote inicial de Hendra de 1994, el antígeno procedía de células infectadas por el VHe sometidas a varios ciclos de congelación y descongelación y a un tratamiento con dodecilsulfato sódico al 0,1% (p/v). Ahora, una forma soluble expresada recombinante de la proteína G del virus Hendra (VHe-sG) (Bossart *et al*., 2005) es el antígeno preferido y su uso ha permitido mejoras en los enzimoinmunoanálisis para el virus de Hendra, incluido el desarrollo de un ELISA de bloqueo para múltiples especies (caballos, gatos y perros) (Di Rubbo *et al*., 2019). Recientemente, se ha descrito un ELISA de captura de anticuerpos IgM (MAC) para la detección de anticuerpos IgM del VHe para su uso en caballos (McNabb *et al*., 2021). El ELISA MAC para IgM de VHe está destinado a complementar otros resultados de pruebas moleculares y serológicas, con uso selectivo, y es la única prueba serológica que puede proporcionar una indicación de infección reciente.

En 1999, en el programa nacional de vigilancia porcina de Malasia, se utilizó un formato ELISA indirecto en el que el antígeno se obtenía mediante tratamiento con detergente no iónico de células infectadas por el VNi. Posteriormente, para controlar los altos niveles de actividad de unión inespecífica en algunos antisueros porcinos, se desarrolló un ELISA modificado basado en la reactividad relativa de los sueros con antígeno de VNi y un antígeno de control derivado de células Vero no infectadas. Para el VNi, también se ha descrito un ELISA que utiliza un antígeno de nucleocápside recombinante (Yu *et al*., 2006), que está configurado para detectar IgG o IgM.

El enfoque actual consiste en analizar todos los sueros reactivos en ELISA mediante VN, considerándose positivos los sueros que reaccionan en la VN. La VN confirmativa debe realizarse en condiciones en las que se controlen adecuadamente los riesgos de trabajar con virus vivos, lo que puede implicar el envío de las muestras a un laboratorio reconocido internacionalmente por disponer de procedimientos establecidos para este tipo de trabajo.

4.2.1. Método del I-ELISA para sG para su uso con suero de caballo – procedimiento analítico

Se ha utilizado una forma soluble expresada recombinante de la proteína G del virus Hendra (Bossart *et al*., 2005) en el ensayo de elección. El ELISA indirecto para proteína G soluble de virus Hendra eliminó casi todos los falsos positivos del I-ELISA de VHe utilizado anteriormente, que utilizaba una preparación vírica cruda de SDS (dodecilsulfato de sodio), con una sensibilidad relativa ligeramente menor (Colling *et al*., 2018). La robustez del ensayo se evaluó en paneles interlaboratorio y de pruebas de competencia (Colling *et al*., 2018). Se considera que este ensayo es adecuado para la vigilancia serológica y para respaldar el desplazamiento

internacional de caballos cuando la neutralización del virus se utiliza para pruebas de seguimiento de muestras de suero que han dado positivo o resultados no concluyentes.

i) Método del I-ELISA

a) Recubrir una placa ELISA dura de fondo plano de microtitulación de 96 pocillos con proteína recombinante sG de VHe diluida a 1/3000 en tampón de recubrimiento PBS A (50 µl/pocillo equivalente a una concentración de recubrimiento de 0,23 µg por ml) durante 1 hora a 37°C en un agitador de placas.

b) Proceder al paso c), o bien sellar la placa con cinta adhesiva y conservar a 4°C (no más de una noche).

c) Bloquear la placa añadiendo 50 µl/pocillo de tampón de bloqueo (5% de leche desnatada en polvo [SMP] en PBS A) (no enjuagar en este paso).

d) Incubar durante 30 a 60 minutos más a 37°C en un agitador de placas.

e) Enjuagar la placa 4 veces con PBS que contenga 0,05% de polisorbato 20 (PBST) utilizando un enjuagador de placas.

f) Diluir los sueros problema y los controles a 1/100 en diluyente ELISA (SMP al 1% en PBST) y añadir 50 µl/pocillo. Nota: diluir las muestras a 1/20 si han sido tratadas con etoxilato de octilfenol/polisorbato 20.

g) Incubar durante 1 hora a 37°C en un agitador de placas, cubrir con sellador de placas.

h) Enjuagar la placa 4 veces con PBST utilizando un enjuagador de placas.

i) Añadir anticuerpo generado en caballo conjugado a peroxidasa de rábano picante 1/5000 en diluyente ELISA (SMP al 1% en PBST).

j) Incubar durante 30 minutos a 37°C en un agitador de placas, cubrir con un sellador de placas.

k) Enjuagar la placa 4× con PBST utilizando el enjuagador de placas.

l) Añadir 50 µl/pocillo de cromógeno/sustrato TMB (tetrametilbencidina) e incubar a temperatura ambiente durante 7-10 minutos.

m) Detener la reacción con 50 µl/pocillo de H_2SO_4 1 M.

n) Leer la densidad óptica a 450 nm en el lector de placas.

Transformación de los datos: Se calculan los valores medios de DO para los resultados de la muestra problema y de la muestra control. La media de DO para el suero control negativo, DO C(–), se resta de todos los valores medios de DO. Estos se convierten en un cociente señal/positivo (S/P) de la mediana del suero positivo bajo (C+).

$$S/P = (DO_{problema} - DO_{NHS})/(\text{media } DO_{L_POS} - DO_{NHS})$$

ii) Criterios de aceptación

La prueba será válida si se cumplen todos los criterios siguientes:

DO C(+) – DO C(–)	0,30 a 1,0
DO C(–)	< 0,25
S/P C(++)	1,4 a 2,4

iii) Interpretación de los resultados

Las muestras con S/P inferior a 0,25 son negativas.

Las muestras con S/P entre 0,25 y 0,4 se consideran no concluyentes y se requiere una VN para aclarar el resultado. Las muestras con S/P > 0,4 se consideran positivas y se requiere una VN para confirmar este resultado.

Una limitación de este ensayo es que no distingue entre los anticuerpos debidos a la infección natural y los debidos a la vacunación (debido a la presencia de proteína G soluble en la actual vacuna contra el virus Hendra). Todo resultado positivo debe interpretarse en el contexto del historial de vacunación del caballo. Además, este ensayo sólo puede utilizarse con suero de caballo, puesto que en el ELISA se utiliza un anticuerpo generado en caballo conjugado a peroxidasa de rábano picante.

4.2.2. Método del B-ELISA para el virus Hendra

Se ha validado un ELISA de bloqueo del virus de Hendra para su uso en sueros equinos, felinos y caninos (Di Rubbo *et al*., 2019).

i) Método ELISA-B

a) Tratar previamente los sueros con etoxilato de octilfenol/polisorbato 20 (dilución 1/5 en PBS que contenga 0,5% [v/v] de etoxilato de octilfenol y 0,5% [v/v] de polisorbato 20).

b) Recubrir una placa ELISA dura de fondo plano de microtitulación de 96 pocillos con 50 µl/pocillo de antígeno G soluble del virus de Hendra en PBS, equivalente a 4,4 ng. Incubar a 37°C durante 1 hora en un agitador de placas.

c) Bloquear las placas añadiendo 50 µl de diluyente ELISA (tampón de bloqueo 1×) directamente a los pocillos sin enjuagar la placa. Poner la placa en el agitador de placas durante 30 minutos a 37°C.

d) Enjuagar las placas 3 veces con PBST.

e) Diluir el suero (30 µl de suero + 120 µl de tampón de bloqueo) y añadir 50 µl por pocillo. Si se utilizan muestras tratadas con etoxilato de octilfenol/polisorbato 20, añadir 50 µl directamente a los pocillos. Poner en el agitador de placas durante 1 hora a 37°C.

f) Añadir anticuerpo monoclonal (MAb) 1.2 diluido en tampón de bloqueo a razón de 50 µl por pocillo. No añadir MAb a los pocillos que contienen el blanco. Poner en el agitador de placas durante 1 hora a 37°C.

g) Enjuagar las placas 3 veces con PBST.

h) Añadir conjugado diluido (anticuerpos Jackson generados en ratón conjugados a peroxidasa de rábano picante) en tampón de bloqueo 50 µl por pocillo.

i) Enjuagar las placas 3 veces con PBST.

j) Añadir 50 µl de cromógeno/sustrato TMB. El color se desarrolla en 7-10 minutos.

k) Añadir 50 µl de solución de parada (ácido sulfúrico 1 M) a todos los pocillos.

l) Leer utilizando un lector de placas a 450 nm en los 5 minutos siguientes a la parada.

Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición (PI) en relación con la DO media de los sueros control negativo:

$$PI = \{100 \times (1 - [DO\ problema_{media} / DO\ control\ neg_{media}])\}$$

ii) Interpretación de los resultados

Si el PI de MAb1.2 es inferior al 33%, el resultado de la prueba es negativo. Si el PI es mayor o igual al 33%, el resultado de la prueba es positivo. Los resultados positivos deben ser

confirmados por la VN. Los resultados negativos se notifican sin necesidad de realizar más pruebas.

Este ELISA de Hendra B tampoco distingue entre los anticuerpos debidos a la infección natural y los debidos a la vacunación (debido a la presencia de G soluble en la actual vacuna contra el virus de Hendra utilizada en caballos). Todo resultado positivo debe interpretarse en el contexto del historial de vacunación del animal.

El siguiente procedimiento del ELISA para el VNi ha sido desarrollado en el *Australian Centre for Disease Preparedness* (ACDP) para sueros porcinos y estandarizado tras estudios de colaboración en el *Veterinary Research Institute*, Ipoh, Malasia. Se han publicado otros protocolos ELISA para el diagnóstico de henipavirus en cerdos.

4.2.3. ELISA indirecto para el virus Nipah (I-ELISA para VNi) para su uso con suero porcino

En el Laboratorio de Referencia de la OMSA puede solicitarse la metodología concreta para la producción y/o el suministro de antígenos de VNi irradiado y células Vero no infectadas.

i) Preparación de los sueros problema

a) La preparación de las muestras de sangre antes de la centrifugación debe realizarse en una cabina de seguridad biológica de clase II con el equipo de protección personal adecuado o en una cabina de clase III.

b) Diluir el suero problema 1/5 en PBS que contenga 0,5% (v/v) de etoxilato de octilfenol y 0,5% (v/v) de polisorbato 20 en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Sellar la placa de microtitulación. El personal de laboratorio debe usar batas y guantes y rociar tanto sus manos como la placa de microtitulación sellada con un desinfectante adecuado antes de retirar la placa de microtitulación de la cabina de bioseguridad para calentarla a 56 °C durante 30 minutos.

c) Mezclar 22,5 µl de suero inactivado por calor con un volumen igual de antígeno de células Vero no infectadas diluido a 1/100 en PBS. Mezclar bien e incubar a 18–22°C durante 30 minutos.

d) Añadir 405 µl de solución de bloqueo (PBS con 5% de suero de pollo y 5% de SMP) para obtener una dilución final de suero de 1/100 e incubar a 18-22°C durante 30 minutos. Añadir alícuotas de 100 µl a dos pocillos que contengan antígeno del VNi y a dos pocillos que contengan antígeno control de células Vero no infectadas, tal como se describe en el paso ii) *Método del ELISA*, a continuación.

ii) Método del ELISA

a) Diluir los antígenos de las células Vero control y el VNi en PBS para garantizar que los pocillos control y de antígeno del virus se recubren en paralelo y con una concentración similar de proteína. El antígeno suele diluirse entre 1/1000 y 1/4000, pero debe determinarse un factor de dilución específico para cada lote de antígeno. Añadir 50 µl de antígeno de virus y de control celular a los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos de la siguiente manera: antígeno de virus en las columnas 1, 3, 5, 7, 9 y 11 y antígeno de control celular en las columnas 2, 4, 6, 8 10 y 12. Incubar a 37°C durante 1 hora con agitación. Las placas también pueden incubarse a 4°C durante la noche.

b) Enjuagar las placas ELISA tres veces con PBS que contenga 0,05% de polisorbato 20 (PBST) (250 µl/pocillo) y bloquear con PBS que contenga 5% de suero de pollo y 5% de SMP (100 µl/pocillo) durante 30 minutos a 37°C con agitación.

c) Enjugar las placas tres veces con PBST y añadir 100 µl de sueros inactivados y absorbidos del paso i) *Preparación de sueros problema* a cada pocillo. Añadir 100 µl de PBST que contenga 5% de suero de pollo y 5% de SMP a los pocillos de conjugado y sustrato control. Incubar las placas sin agitar durante 1 hora a 37°C y enjuagar tres veces con PBST.

d) Diluir el conjugado de proteína A/G-peroxidasa de rábano picante en PBST que contenga un 1% (p/v) de leche desnatada en polvo. El factor de dilución es aproximadamente 1/50.000. Mezclar bien y añadir 100 µl de conjugado de proteína A a todos los pocillos excepto a los pocillos de sustrato control. Añadir 100 µl de PBST que contenga un 1% de SMP a los pocillos de sustrato control. Incubar las placas durante 1 hora a 37°C sin agitar y enjuagar cuatro veces con PBST.

e) Preparar el cromógeno/sustrato (3,3',5,5'-tetrametilbencidina; TMB) disolviendo un comprimido (de 1 mg) en 10 ml de tampón citrato fosfato 0,05 M, pH 5,0, y añadir 2 µl de H_2O_2 fresco al 30% (v/v). Añadir 100 µl del sustrato TMB a cada pocillo. Incubar durante 10 minutos a 18-22°C y detener la prueba añadiendo 100 µl de ácido sulfúrico 1 M a cada pocillo.

f) Leer las placas después de medir la DO del blanco en un pocillo de sustrato control. La densidad óptica (DO) a 450 nm en el antígeno de VNi y el antígeno de células Vero control se utilizan para calcular un cociente de DO para cada suero (DO en el antígeno de VNi/DO en el antígeno de células Vero control).

iii) Interpretación de los resultados

Las muestras con un valor DO del antígeno del VNi inferior a 0,20 son negativas. Las muestras con un valor de DO del antígeno del VNi superior a 0,2 se evalúan según el valor del cociente de DO (antígeno/control) como sigue:

a) Con un cociente de DO >2,0 se consideran positivas

b) Con un cociente de DO de entre 2,0 y 2,2 deben considerarse no concluyentes

Los sueros no concluyentes y positivos deben analizarse mediante VN para confirmar o aclarar el resultado.

4.3. Pruebas con microesferas

Una ventaja de utilizar ensayos basados en microesferas es que el suero puede analizarse para detectar anticuerpos contra los virus Hendra y Nipah en el mismo pocillo utilizando un único experimento en lugar de múltiples pruebas (ELISA y VN), como validaron McNabb *et al*. (2014). Los métodos validados a continuación son ejemplos de tales ensayos.

Se han desarrollado dos ensayos serológicos multiplexados basados en microesferas que utilizan tecnología basada en microesferas magnéticas e incorporan la identificación de anticuerpos contra el VHe o el VNi en una sola prueba (McNabb *et al*., 2014). Ambos ensayos miden los anticuerpos contra la glicoproteína soluble (sG) recombinante expresada del VHe y el VNi. Un ensayo mide los anticuerpos que se unen directamente a la sG (ensayo de unión) y el otro ensayo mide la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión del receptor del henipavirus ephrinB2 a la sG (ensayo de bloqueo). Las proteínas sG recombinantes de VHe o VNi se acoplan primero a perlas magnéticas identificables individualmente. A continuación, las perlas acopladas se mezclan con sueros problema. Para el ensayo de unión, los sueros unidos se detectan utilizando un conjugado secundario de proteína A/G biotinilada y estreptavidina-ficoeritrina (S-PE). Para el ensayo de bloqueo, los sueros deben competir con la efrinaB2 biotinilada para unirse a la sG, y el S-PE se utiliza de nuevo para cuantificar la reacción. A continuación, las microesferas son interrogadas por láser en un sistema de inmunoanálisis multiplexado basado en microesferas, y los resultados se registran como la mediana de la intensidad de la fluorescencia (IMF) de 100 microesferas. Al igual que en el caso del ELISA, los sueros sospechosos de ser positivos se analizan mediante VN.

4.3.1. Procedimiento para el acoplamiento de las perlas

i) Activación de las perlas

a) Llevar el tampón de activación de microesferas (NaH_2PO_4 0,1 M, pH 6,2) a temperatura ambiente antes de su uso.

NOTA: Proceder con cuidado de proteger las microesferas de la luz, ya que se fotoblanquean (cubrir los tubos con papel de aluminio cuando sea posible).

b) Seleccionar las microesferas magnéticas carboxiladas suministradas como $1,25 \times 10^7$ microesferas/ml para la reacción de acoplamiento de proteínas para el virus correspondiente (VHe o VNi). Agitar las perlas en vórtex durante 30 segundos a velocidad media y, a continuación, sonicar las perlas mediante sonicación en baño durante ~30-60 segundos. Es importante que las microesferas se resuspendan completamente como partículas monodispersas individuales.

c) Transferir 300 µl de microesferas magnéticas carboxiladas ($3,75 \times 10^6$ microesferas) a microtubos de 2 ml con tapón de rosca. Colocar los tubos en un separador magnético y dejar que se produzca la separación durante 30-60 segundos. Con los tubos todavía colocados en el separador magnético, eliminar el sobrenadante con una pipeta; tener cuidado de no alterar el precipitado de microesferas.

d) Lavar las microesferas añadiendo 300µl de PBST a los tubos y agitando en vórtex. Colocar los tubos en un separador magnético y dejar que se produzca la separación durante 30-60 segundos. Con los tubos todavía colocados en el separador magnético, eliminar el sobrenadante con una pipeta; tener cuidado de no alterar el precipitado de microesferas. Repetir la operación.

e) Añadir 600 µl de tampón de activación de microesferas a los tubos y agitar. Colocar los tubos en un separador magnético y dejar que se produzca la separación durante 30-60 segundos. Con los tubos todavía colocados en el separador magnético, eliminar el sobrenadante con una pipeta; tener cuidado de no alterar el precipitado de microesferas. Repetir la operación.

f) Añadir 240 µl de tampón de activación de microesferas a los tubos, cubrir con papel de aluminio y agitar durante 3 minutos.

g) Preparar los reticulantes (1-etil-3-[3-dimetilamino-propil] carbodiimida [EDC] = un reticulante de longitud cero reactivo con carboxi y amina, y S-NHS = sulfo-N-hidroxisulfosuccinimida) en tampón de activación de microesferas inmediatamente antes de su uso hasta una concentración de 50 mg/ml (20 µl de tampón/mg de polvo). Añadir 30 µl del EDC de 50 mg/ml recién hecho a los tubos, seguidos de 30 µl del S-NHS de 50 mg/ml recién hecho a los tubos. NOTA: Desechar la porción no utilizada y preparar una nueva cada vez.

h) Cubrir los tubos con papel de aluminio y agitar las microesferas a temperatura ambiente durante 20 minutos.

i) Mientras se incuban las microesferas, preparar las proteínas sG. Utilizar 90 µg de sG de VHe y de sG de NiV y utilizar PBS (no utilizar PBST, ya que bloquea los grupos carboxi) para llevar las proteínas a un volumen final de 300 µl.

j) Tras la incubación, las microesferas ya están activadas y listas para el acoplamiento. Colocar los tubos en un separador magnético y dejar que se produzca la separación durante 30-60 segundos. Con los tubos aún colocados en el separador magnético, retirar el sobrenadante con una pipeta; proceder con cuidado de no alterar el precipitado de microesferas.

ii) Acoplamiento de la proteína

a) Lavar las microesferas añadiendo 300 µl de PBS a los tubos y agitando en vórtex (no utilizar PBST porque bloquea los grupos carboxílicos). Colocar los tubos en un separador magnético y dejar que se produzca la separación durante 30-60 segundos. Con los tubos aún colocados en el separador magnético, retirar el sobrenadante con una pipeta; proceder con cuidado de no alterar el precipitado de microesferas.

b) Añadir la totalidad de los 300 µl de proteína preparada anteriormente a las microesferas activadas.

c) Cubrir los tubos con papel de aluminio y agitar las microesferas moderadamente a temperatura ambiente durante 2 horas.

d) La proteína ya está acoplada a las microesferas. Colocar los tubos en un separador magnético y dejar que se produzca la separación durante 30-60 segundos. Con los

tubos todavía colocados en el separador magnético, eliminar el sobrenadante con una pipeta; proceder con cuidado de no alterar el precipitado de microesferas.

e) Lavar las microesferas dos veces con 300 µl de PBST como se ha descrito anteriormente. Colocar los tubos en un separador magnético y dejar que se produzca la separación durante 30-60 segundos. Con los tubos todavía colocados en el separador magnético, eliminar el sobrenadante con una pipeta; proceder cuidado de no alterar el precipitado de microesferas.

f) Resuspender las microesferas acopladas en 1,8 ml de tampón de conservación de microesferas (10 ml de PBS, 1% de albúmina de suero bovino [BSA], 0,05% de azida sódica y 1 pastilla de inhibidor de proteasa) y conservar a 4°C.

NOTAS: Comprobar la reactividad de sG con sueros de henipavirus antes de su uso. Utilizar 1 µl de microesferas acopladas por pocillo para ensayos serológicos de unión y bloqueo de henipavirus (este procedimiento acopla suficientes microesferas para analizar unos 1800 sueros). Las microesferas acopladas pueden conservarse a 4°C durante al menos 1 año y mantienen la reactividad.

4.3.2. Procedimiento analítico para la unión a henipavirus

i) Procedimiento analítico

a) Seleccionar perlas acopladas a sG de VHe y VNi (previamente acopladas). Agitar las perlas en vórtex durante 30 segundos a velocidad máxima y, a continuación, sonicar las perlas mediante sonicación en baño durante ~30-60 segundos.

b) Diluir las microesferas en bloqueador (leche desnatada al 2% en PBST) a una concentración adecuada para el número de sueros que se van a analizar (1 µl de cada conjunto de microesferas/pocillo).

c) Añadir 100 µl de microesferas diluidas a los pocillos apropiados de una placa de fondo plano de 96 pocillos.

d) Cubrir la placa con papel de aluminio y agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador de placas.

e) Colocar la placa en un soporte magnético y dejar que se produzca la separación durante 30-60 segundos. Con la placa todavía en el soporte magnético, verter el contenido en el fregadero, secarlo suavemente sobre papel de secar y retirar la placa del soporte magnético.

f) Enjuagar dos veces con PBST o, como alternativa, utilizar un enjuagador automático de placas magnéticas.

g) Añadir 100 µl de los sueros control y problema diluidos a 1/100 en PBST a los pocillos (sueros de murciélago diluidos a 1/50).

NOTA: Todos los sueros deben inactivarse térmicamente durante 35 minutos a 56°C antes de la prueba.

h) Cubrir la placa con papel de aluminio y agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador de placas.

i) Poner la placa en un soporte magnético y dejar que se produzca la separación durante 30-60 segundos. Con la placa todavía en el soporte magnético, verter el contenido en el fregadero y secarlo suavemente sobre papel de secar; retirar la placa del soporte magnético.

j) Enjuagar dos veces con PBST o, como alternativa, utilizar el enjuagador automático de placas magnéticas.

k) Diluir la proteína A biotinilada 1/500 (2 µg/ml) y la proteína G biotinilada 1/250 (2 µg/ml) en el mismo tubo en PBST y añadir 100 µl a los pocillos.

l) Cubrir la placa con papel de aluminio y agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador de placas.

m) Colocar la placa en un soporte magnético y dejar que se produzca la separación durante 30-60 segundos. Con la placa todavía en el soporte magnético, verter el contenido en el fregadero y secarlo suavemente sobre papel de secar; retirar la placa del soporte magnético.

n) Enjuagar dos veces con PBST o, como alternativa, utilizar un enjuagador automático de placas magnéticas.

o) Añadir 100 µl de estreptavidina R-PE diluida 1/1000 (1 µg/ml) en PBST a los pocillos.

p) Cubrir la placa con papel de aluminio y agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador de placas.

q) Leer la placa utilizando un inmunoanálisis multiplexado en el que se usen microesferas, y el software adecuado.

ii) Interpretación de los resultados

Los resultados pueden interpretarse a partir de los valores brutos de intensidad media de la fluorescencia (IMF) o pueden transformarse en un porcentaje relativo a la IMF del control positivo (%P) mediante la siguiente fórmula:

(IFM del suero problema/IFM del control positivo) × 100

Una muestra que dé una IFM >1500 o un %P >5 debe someterse de nuevo a la prueba de unión. Si la muestra sigue siendo positiva, deberá analizarse mediante VN para su confirmación.

4.3.3. Procedimiento analítico para el bloqueo de henipavirus

i) Procedimiento analítico

a) Seleccionar perlas acopladas a sG de VHe y VNi (previamente acopladas. Agitar las microesferas en vórtex durante 30 segundos a velocidad máxima y, a continuación, sonicar las microesferas mediante sonicación en baño durante ~30-60 segundos.

b) Diluir las microesferas en bloqueador (leche desnatada al 2% en PBST) a una concentración adecuada para el número de sueros que se van a analizar (1 µl de cada conjunto de microesferas/pocillo).

c) Añadir 100 µl de microesferas diluidas a los pocillos apropiados de una placa de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos.

d) Cubrir la placa con papel de aluminio y agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador de placas.

e) Colocar la placa en un soporte magnético y dejar que se produzca la separación durante 30-60 segundos. Con la placa todavía en el soporte magnético, verter el contenido en el fregadero, secarlo suavemente sobre papel de secar y retirar la placa del soporte magnético.

f) Enjuagar dos veces con PBST. O, como alternativa, utilizar un enjuagador automático de placas magnéticas.

g) Añadir 100 µl de los sueros control y problema diluidos a 1/50 en PBST a los pocillos (sueros de murciélago diluidos 1/25).

NOTA: Todos los sueros deben inactivarse térmicamente durante 35 minutos a 56°C antes de la prueba.

h) Cubrir la placa con papel de aluminio y agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador de placas.

i) Colocar la placa en un soporte magnético y dejar que se produzca la separación durante 30-60 segundos. Con la placa todavía en el soporte magnético, verter el contenido en el fregadero y secarlo suavemente sobre papel de secar; retirar la placa del soporte magnético.

j) Enjuagar dos veces con PBST o, como alternativa, utilizar el enjugador automático de placas magnéticas.

k) Diluir ephrinB2 biotinilado 1/1000 (50 ng/ml) en PBST y añadir 100 µl a los pocillos.

l) Cubrir la placa con papel de aluminio y agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador de placas.

m) Colocar la placa en un soporte magnético y dejar que se produzca la separación durante 30-60 segundos. Con la placa todavía en el soporte magnético, verter el contenido en el fregadero y secarlo suavemente sobre papel de secar; retirar la placa del soporte magnético.

n) Enjuagar dos veces con PBST o, como alternativa, utilizar un enjuagador automático de placas magnéticas.

o) Añadir 100 µl de estreptavidina R-PE diluida 1/1000 (1 µg/ml) en PBST a los pocillos.

p) Cubrir la placa con papel de aluminio y agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos en un agitador de placas.

q) Leer la placa utilizando un sistema de inmunoensayo multiplexado en el que se usen microesferas, y el software adecuado.

ii) Interpretación de los resultados

Para el ensayo de bloqueo, las lecturas de IFM brutas se convierten en un porcentaje de inhibición (%I) mediante la siguiente fórmula: (1 - [IFM suero problema/IFM suero negativo]) × 100

Una muestra que dé un %I >15 deberá someterse de nuevo a la prueba de bloqueo. Si la muestra sigue siendo positiva, deberá someterse a una prueba de VN para su confirmación.

4.4. Estrategia DIVA

En el *Australian Centre for Disease Preparedness* se utiliza una prueba de diagnóstico del VHe que permite una estrategia DIVA para ayudar a distinguir entre caballos infectados por el virus de Hendra y caballos vacunados con la vacuna contra la proteína sG del virus de Hendra. Actualmente, está en proceso de validación (para más detalles, se puede contactar con el Laboratorio de Referencia de la OMSA).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

El brote original del VNi de Malasia y Singapur se relacionó con la transmisión del virus de cerdos a humanos, y todas las infecciones humanas por el virus Hendra de Australia se han relacionado con el contacto con caballos enfermos. El desarrollo de vacunas veterinarias contra los henipavirus es importante tanto para proteger a las especies de animales domésticos susceptibles (es decir, porcinos, equinos, felinos y caninos) como para reducir la transmisión de los animales domésticos a los humanos. Este fue el motivo por el que se desarrolló la vacuna contra el VHe que actualmente está disponible para su uso en caballos en Australia. No existe ninguna vacuna aprobada para la prevención del VHe en humanos.

2. Vacuna contra la proteína G soluble de henipavirus

Un estudio preliminar sobre el VHe en hurones (Pallister *et al*., 2011) arrojó datos sólidos acerca del hecho de que una vacuna basada en una subunidad de glicoproteína G soluble del VHe (HeVsG) podría prevenir la enfermedad en animales expuestos a una dosis del VHe que, de otro modo, sería letal. La glicoproteína G expresada en la superficie de los henipavirus tiene la función crítica de iniciar la infección uniéndose a los receptores de las células hospedadoras, y los anticuerpos dirigidos contra esta proteína pueden neutralizar el virus. El fabricante de la vacuna ha formulado una vacuna equina contra el virus Hendra utilizando HeVsG y un adyuvante patentado. La

vacuna, lanzada en Australia en noviembre de 2012, solo puede ser administrada por veterinarios registrados. Para la vacunación inicial, deben administrarse dos dosis de vacuna con un intervalo de 3 a 6 semanas entre ambas a caballos de cuatro meses de edad o más, seguidas de una tercera vacuna 6 meses después de la segunda dosis. Para lograr un efecto continuado, el fabricante recomienda una dosis de refuerzo cada 12 meses.

3. Vacunas experimentales

Recientemente, la OMS incluyó el virus Nipah como uno de los 11 agentes patógenos prioritarios con más probabilidad de causar brotes graves en un futuro próximo. Paralelamente, se ha desarrollado un plan de acción de I+D para la prevención de epidemias (*R&D Blueprint for Action to Prevent Epidemics*) que establece una plataforma de preparación mediante I+D destinada a acelerar la investigación y el desarrollo de productos antes de las epidemias y durante las mismas (OMS, 2019). Se ha confirmado que al menos 13 candidatos a vacuna contra el virus Nipah se encuentran en fase de desarrollo preclínico (Gouglas *et al*., 2019). Los candidatos se han centrado en el uso de la glicoproteína (G) y/o la proteína de fusión (F) del VNi como inmunógenos en diversas plataformas, incluidas vacunas de ADN, vacunas de subunidades, vectores no replicantes y vectores replicantes. Una vacuna basada en la proteína G del VNi-B en un vector de adenovirus símico de replicación deficiente en hámsters sirios (ChAdOx1 NiVB) ha mostrado resultados prometedores (Van Doremalen *et al*., 2019). Un régimen de solo cebado, así como de cebado reforzado, protegió a los hámsteres sirios frente a la provocación con una dosis letal de VNi-B y de VNi-M.

REFERENCES

Annand E.J., Horsburgh B.A., Xu K., Reid P.A., Poole B., de Kantzow M.C., Brown N., Tweedie A., Michie M., Grewar J.D., Jackson A.E., Singanallur N.B., Plain K.M., Kim K., Tachedjian M., van der Heide B., Crameri S., Williams D.T., Secombe C., Laing E.D., Sterling S., Yan L., Jackson L., Jones C., Plowright R.K., Peel A.J., Breed A.C., Diallo I., Dhand N.K., Britton P.N., Broder C.C., Smith I. & Eden J.-S. (2022). Novel Hendra Virus Variant Detected by Sentinel Surveillance of Horses in Australian. *Emerg. Infect. Dis.,* **28** https://doi.org/10.3201/eid2803.211245

Arunkumar G., Chandni R., Mourya D.T., Singh S.K., Sadanandan R., Sudan P., Bhargava B. & Nipah Investigators People and Health Study Group (2019). Outbreak investigation of Nipah virus disease in Kerala, India, 2018. *J. Infect. Dis.,* **219**, 1867–1878. doi:10.1093/infdis/jiy612.

Bossart K.N., Crameri G., Dimitrov A.S., Mungall B.A., Feng Y.R., Patch J.R., Choudhary A., Wang L.F., Eaton B.T. & Broder C.C. (2005). Receptor binding, fusion inhibition, and induction of cross-reactive neutralizing antibodies by a soluble G glycoprotein of Hendra virus. *J. Virol*., **79**, 6690–6702.

Ching P.K.G., de los Reyes V.C., Sucaldito M.N., Tayag E., Columna-Vingno A.B., Malbas F.F., Bolo G.C., Sejvar J.J., Eagles D., Playford G., Dueger E., Kaku Y., Morikawa S., Kuroda M., Marsh G.A., McCullough S. & Foxwell R. (2015). Outbreak of henipavirus infection, Philippines, 2014. *Emerg. Infect. Dis*., **21**, 328–331.

Chua K.B., Bellini W.J., Rota P.A., Harcourt B.H., Tamin A., Lam S.K., Ksiazek T.G., Rollin P.E., Zaki S.R., Shieh W.J., Goldsmith C.S., Gubler D.J., Roehrig J.T., Eaton B., Gould A.R., Olson J., Field H., Daniels P., Ling A.E., Peters C.J., Anderson L.J. & Mahy B.W.J. (2000). Nipah virus: A recently emergent deadly paramyxovirus. *Science,* **288**, 1432–1435.

Chua K.B., Koh C.L., Hooi P.S., Kong, F.W., Khong J.H., Chua B.H., Chan Y.P, Lim M.E. & Lam S.K. (2002). Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying foxes. *Microbes and Infection*, **4**, 145–151.

Colling A., Lunt R., Bergfeld J., McNabb L., Halpin K., Juzva S., Newberry K., Morrissy C., Loomes C., Warner S., Diallo I., Kirkland P., Broder C.C., Carlile G., Loh M-H., Waugh C., Wright L., Watson J., Eagles D., Zuelke K., McCullough S. & Daniels P. (2018). A network approach for provisional assay recognition of a Hendra virus antibody ELISA: test validation with low sample numbers from infected horses. *J. Vet. Diagn. Invest.,* **30**, 362–369. doi:10.1177/1040638718760102

Crameri G., Wang L.F., Morrissy C., White J. & Eaton B.T. (2002). A rapid immune plaque assay for the detection of Hendra and Nipah viruses and anti-virus antibodies. *J. Virol. Methods*, **99**, 41–51.

Daniels P., Ksiazek T. & Eaton B.T. (2001). Laboratory diagnosis of Nipah and Hendra virus infections. *Microbes Infect.,* **3**, 289–295.

Di Rubbo A., McNabb L., Klein R., White J.R., Colling A., Dimitrov D.S., Broder C.C, Middleton D. & Lunt R.A. (2019). Optimization and diagnostic evaluation of monoclonal antibody-based blocking ELISA formats for detection of neutralizing antibodies to Hendra virus in mammalian sera. *J. Virol. Methods,* **274**, 113731.

Feldman K.S., Foord A., Heine H.G., Smith I.L., Boyd V., Marsh G.A., Wood J.L.N., Cunningham A.A. & Wang L.F. (2009). Design and evaluation of consensus PCR assays for henipaviruses. *J. Virol. Methods*, **161**, 52–57.

Gouglas D., Le T.T., Henderson K., Kaloudis A., Danielsen T., Hammersland N.C., Robinson J.M., Heaton P.M. & Røttingen J-A. (2018). Estimating the cost of vaccine development against epidemic infectious diseases: a cost minimisation study. *Lancet Glob. Health,* 6:e1386–e1396. doi:10.1016/S2214-109X(18)30346-2.

Halpin K., Young P.L., Field H.E. & Mackenzie J.S. (2000). Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J. Gen. Virol.,* **81**, 1927–1932.

Hanna, J.N., McBride W.J., Brookes D.L., Shield J., Taylor C.T., Smith I.L., Craig S.B. & Smith G.A. (2006). Hendra virus infection in a veterinarian. *MJA*, **185**, 562–564.

Hayman D.T., Suu-Ire R., Breed A.C., McEachern J.A., Wang L., Wood J.L. & Cunningham A.A. (2008). Evidence of henipavirus infection in West African fruit bats. *PLoS ONE*, **3**, e2739.

Hooper P., Zaki S., Daniels P. & Middleton D. (2001). Comparative pathology of the diseases caused by Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect.,* **3**, 315–322.

Hyatt A.D., Zaki S.R., Goldsmith C.S., Wise T.G. & Hengstberger S.G. (2001). Ultrastructure of Hendra virus and Nipah virus within cultured cells and host animals. *Microbes Infect.,* **3**, 297–306.

Kaku Y., Noguchi A., Marsh G.A., McEachern J.A., Okutani A., Hotta K., Bazartseren B., Fukushi S., Broder C.C., Yamada A., Inoue S., Wang L.F. (2009). A neutralization test for specific detection of Nipah virus antibodies using pseudotyped vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein. *J. Virol. Methods*, **160**, 7–13.

Lee S-H., Kim K., Kim J., No J.S., Park K., Budhathoki S., Lee S.H., Lee J., Cho S.H., Cho S., Lee G-Y., Hwang J., Kim H-C., Klein T.A., Uhm C-S., Kim W-K., Song J-W. (2021) Discovery and Genetic Characterization of Novel Paramyxoviruses Related to the Genus Henipavirus in Crocidura Species in the Republic of Korea. *Viruses*. **13**, 2020.

Luby S.P., Rahman M., Hossain M.J., Blum L.S., Husain M.M., Gurley E., Khan R., Ahmed B.N., Rahman S., Nahar N., Kenah E., Comer J.A. & Ksiazek T.G. (2006). Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.,* **12**, 1888–1894.

Marsh G.A., Haining J., Hancock T.J., Robinson R., Foord A.J., Barr J.A., Riddell S., Heine H.G., White J.R., Crameri G., Field H.E., Wang L.F. & Middleton D. (2011). Experimental infection of horses with Hendra virus/Australia/horse/2008/Redlands. *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 2232–2238.

Marsh G.A., de Jong C., Barr J.A., Tachedjian M., Smith C., Middleton D., Yu M., Todd S., Foord A.J., Haring V., Payne J., Robinson R., Broz I., Crameri G., Field H.E. & Wang LF. (2012). Cedar virus: a novel Henipavirus isolated from Australian bats. *PLoS Pathog*, **8**, e1002836.

McNabb L., Andiani A., Bulavaite A., Zvirbliene A., Sasnauskas K. & Lunt R. (2021) Development and validation of an IgM antibody capture ELISA for early detection of Hendra virus. *J. Virol. Methods*, **298**, 114296.

McNabb L., Barr J., Crameri G., Juzva S., Riddell S., Colling A., Boyd V., Broder C., Wang L.F. & Lunt R. (2014). Henipavirus microsphere immuno-assays for detection of antibodies against Hendra virus. *J. Virol. Methods*, **200**, 22–28.

Murray K., Selleck P., Hooper P., Hyatt A., Gould A., Gleeson L., Westbury H., Hiley L., Selvey L. & Rodwell B. (1995). A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. *Science,* **268**, 94–97.

Nor M.N.M., Gan C.H. & Ong B.L. (2000). Nipah virus infection of pigs in peninsular Malaysia. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.,* **19**, 160–165.

PALLISTER J., MIDDLETON D., WANG L.F., KLEIN R., HAINING J., ROBINSON R., YAMADA M., WHITE J., PAYNE J., FENG Y.R., CHAN Y.P. & BRODER C.C. (2011). A recombinant Hendra virus G glycoprotein-based subunit vaccine protects ferrets from lethal Hendra virus challenge. *Vaccine*, **29**, 5623–56230.

RAHMAN M.Z., ISLAM M.M., HOSSAIN M.E., RAHMAN M.M., ISLAM A., SIDDIKA A., HOSSAIN M.S.S., SULTANA S., RAHMAN M., KLENA J.D., FLORA M S., DASZAK P., EPSTEIN J.H., LUBY S. P. & GURLEY E. S. (2021). Genetic diversity of Nipah virus in Bangladesh. *Int. J. Infect. Dis.*, *102*, 144–151. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.041

REYNES J., COUNOR D., ONG S., FAURE C., SENG V., MOLIA S., WALSTON J., GEORGES-COURBOT M.C., DEUBEL V. & SARTHOU J. (2005). Nipah virus in Lyle's flying foxes, Cambodia. *Emerg. Infect. Dis.,* **11**, 1042–1047.

SMITH I.L., HALPIN K., WARRILOW D. & SMITH G.A. (2001). Development of a fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for the detection of Hendra virus. *J. Virol. Methods*, **98**, 33-40.

VAN DOREMALEN N., LAMBE T., SEBASTIAN S., BUSHMAKER T., FISCHER R., FELDMANN F., HADDOCK E., LETKO M., AVANZATO V.A., RISSANEN I., LACASSE R., SCOTT D., BOWDEN T.A., GILBERT S. & MUNSTER V. (2019). A single-dose ChAdOx1-vectored vaccine provides complete protection against Nipah Bangladesh and Malaysia in Syrian golden hamsters. *PLoS Negl. Trop. Dis.,* **13**:e0007462. doi:10.1371/journal.pntd.0007462.

WACHARAPLUESADEE S. & HEMACHUDHA T. (2007). Duplex nested RT-PCR for detection of Nipah virus RNA from urine specimens of bats. *J. Virol. Methods*, **141**, 97–101.

WANG J., ANDERSON D.E., HALPIN K., HONG X., CHEN H., WALKER S., VALDETER S., VAN DER HEIDE B., NEAVE M.J., BINGHAM J., O'BRIEN D., EAGLES D., WANG L.F. & WILLIAMS D.T. (2021). A new Hendra virus genotype found in Australian Flying foxes. *Virol. J.,* **18**, 197.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2019). WHO R&D Blueprint: Priority Diagnostics for Nipah Use Cases and Target Product Profiles. World Health Organization, Geneva, Switzerland. https://www.who.int/docs/default-source/blue-print/call-for-comments/who-nipah-dx-tpps-d.pdf?sfvrsn=8a856311_4.

WU Z., YANG L., YANG F., REN X., JIANG J., DONG J., SUN L., ZHU Y., ZHOU H. & JIN Q. (2014). Novel Henipa-like virus, Mojiang Paramyxovirus, in rats, China, 2012. *Emerg. Infect. Dis.,* **20**, 1064–1066.

YUEN K.Y., N.S. FRASER, HENNING J., HALPIN K., GIBSON J.S. & STEWART A.J. (2021). Hendra virus: epidemiology dynamics in relation to climate change, diagnostic tests and control measures. *One Health*, **12**, doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100207.

YU F., KHAIRULLAH N.S., INOUE S., BALASUBRAMANIAM V., BERENDAM S.J., TEH L.K., IBRAHIM N.S., ABDUL RAHMAN S., HASSAN S.S., HASEBE F., SINNIAH M. & MORITA K. (2006). Serodiagnosis using recombinant Nipah virus nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.,* **44**, 3134–3138.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OMSA para las enfermedades víricas de Nipah y Hendra (puede consultarse la página web de la OMSA: https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3)
Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OMSA para cualquier otro dato sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la las enfermedades víricas de Nipah y Hendra

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2004. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2015.