

CAPÍTULO 3.1.15.

ENFERMEDADES POR LOS VIRUS DE NIPAH Y DE HENDRA

RESUMEN

Los virus de Hendra (VHe) y de Nipah (VNi) surgieron en los años 1990 como causa de brotes de enfermedades zoonóticas. El primer brote descrito de VHe tuvo lugar en Brisbane, Australia, en 1994. En este caso, el VHe causó una enfermedad respiratoria grave y la muerte de 13 caballos y de un entrenador. El VNi apareció en la población humana en Malasia entre septiembre de 1998 y abril de 1999 como causa de encefalitis agudas, después de propagarse principalmente como una infección respiratoria grave de etiología desconocida en la población porcina. El VHe ha causado la muerte de cuatro de siete personas infectadas en Australia, mientras que se han dado más de 600 casos de VNi en humanos, provocando más de 400 muertos en Malasia, Filipinas, Singapur, Bangladesh y la India. Los murciélagos frugívoros (zorros voladores) del género *Pteropus* son los reservorios de ambos virus.

La infección de caballos por el VHe no tiene una presentación patognomónica. Los caballos pueden presentar inicialmente signos respiratorios, neurológicos o inespecíficos. Los signos respiratorios son taquipnea o secreción nasal espumosa. Los neurológicos, ataxia, inclinación de la cabeza, desplazamientos en círculos, convulsiones, depresión o decúbito. Los signos inespecíficos son fiebre alta, taquicardia, falta de apetito o cólicos. La infección por el VHe en los caballos no siempre es mortal, ni parece ser muy contagiosa entre caballos. El contacto directo con orina, saliva o productos del parto de zorro volador infectado es necesario para su transmisión entre el zorro volador y el caballo. Los caballos infectados en pastos casi nunca transmiten el virus a otros caballos. La transmisión parece tener lugar de forma más rápida en entornos cerrados, como establos o clínicas veterinarias, y se asocia al contacto con líquidos corporales de caballos infectados.

La infección porcina por el VNi es muy contagiosa y se caracteriza por fiebre con afectación respiratorio y, a veces, neurológica, pero muchas infecciones son subclínicas. Algunos cerdos infectados presentan una tos seca de intensidad inusual, pero muchas infecciones son subclínicas. También se ha observado aborto.

Ambos virus pueden afectar a los animales de compañía, pero no parecen intervenir en la epidemiología de la enfermedad.

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 del caballo y el VHe de los caballos. Las investigaciones de los brotes de casos de VNi en humanos de Bangladesh han apuntado a la infección humana por murciélagos pterópidos directamente sin hospedador intermediario/amplificador. Solo se ha observado la transmisión entre humanos en brotes del VNi de Bangladesh y de la India.

El VHe y el VNi están estrechamente relacionados y son los miembros fundadores del género *Henipavirus*, familia *Paramyxoviridae*. Hay 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 2012-2018 ha mostrado una divergencia genética durante 1995 que dio lugar a dos sublinajes: VNi-B1 y VNi-B2 (Rahman et al., 2021). Se han reconocido dos genotipos de VHe, a saber, VHe-g1 y VHe-g2. El VHe y el VNi son agentes patógenos humanos peligrosos. Todas las manipulaciones de laboratorio con cultivos vivos o material potencialmente infectado/contaminado deben realizarse a un nivel de bioseguridad y contención adecuado.

Detección del agente: Dado el potencial zoonótico y las altas tasas de mortalidad asociadas a estos virus, los laboratorios de diagnóstico pueden decidir, siguiendo una evaluación del riesgo exhaustiva, emplear técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) para la detección, en lugar de intentar la propagación del virus infeccioso. Tanto el VHe como el VNi pueden propagarse en gran variedad de cultivos celulares. Debe intentarse el aislamiento del virus a partir de muestras de campo no fijadas, pero solo en situaciones en las que pueda garantizarse la seguridad del operario. Los procedimientos de identificación del virus comprenden la RT-PCR, la inmunotinción de células infectadas, y la neutralización con antisueros específicos contra los virus.

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 decidir evitar las pruebas serológicas que utilizan virus vivos. Se dispone de pruebas de neutralización vírica (VN) y de enzimoimmunoanálisis (ELISA). Los ELISA se utilizan como prueba de cribado, y la VN, como prueba de confirmación. La capacidad de los anticuerpos anti-VHe y anti-VNi de neutralizar de forma cruzada significa 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 aprobada 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 *Orthoparamyxovirinae*, género *Henipavirus*. Tienen propiedades morfológicas y fisicoquímicas características de los paramixovirus. Son pleomórficos y tienen envoltura, y nucleocápsidas en espineza. 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, también denominados “zorros voladores”, y que son miembros del género *Pteropus*, familia *Pteropodidae*. Se han detectado anticuerpos contra el VHe en las cuatro especies de *Pteropus* australianos, y su seroprevalencia varía con el tiempo. Hasta la fecha, todos los casos de VHe en caballos han tenido lugar dentro de la zona geográfica de los murciélagos *Pteropus*, lo cual se correlaciona con la costa este de Australia. Se han detectado anticuerpos contra el VNi o contra virus estrechamente relacionados con aquél en murciélagos pterópodos en la mayor parte de su territorio. Se ha aislado el VHe-g1 de zorros voladores de Australia (Halpin et al., 2000), y se ha detectado un genotipo de VHe por primera vez (VHe-g2) en dos especies de zorro volador 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, en un estudio pequeño se observó un 39% de *Eidolon helvum*, un murciélago frugívoro no pterópido, presenta anticuerpos contra el VNi (Hayman et al., 2008). También se obtuvieron Secuencias afines al Henipavirus de *Eidolon helvum* en Ghana (Hayman et al., 2008). La detección de anticuerpos henipavirus y de secuencias de los mismos en murciélagos de África indica que el territorio con posibles infecciones por el VNi podría ser mayor de lo que se creía.

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). Inicialmente, el virus se denominó morbilivirus equino, pero análisis genéticos posteriores indicaron que era suficientemente diferente como para pertenecer a un género propio. Ha habido al menos un episodio de diseminación cada año desde 2006, y la mayoría de los acontecimientos han afectado solo a un pequeño número de caballos. En un estudio retrospectivo, se aisló VHe-g2 de un caso equino de 2015 (Annand et al., 2022). Hasta la fecha, siete casos humanos han dado lugar a cuatro muertes (tasa de mortalidad del 57%). Los signos clínicos oscilan entre una infección gripal y una neumonía o encefalitis grave que provoca la muerte (Yuen et al., 2021). Todas las personas infectadas habían estado en contacto directo con líquidos corporales infectados de caballos infectados, debido a que realizaron intervenciones invasivas y/o a que no llevaban un equipo de protección personal completo.

Los estudios retrospectivos de muestras histológicas de archivo indican que el VNi había 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). En contraste con la enfermedad respiratoria equina causada por el VHe, que fue frecuentemente mortal pero caracterizada por una transmisibilidad baja en condiciones de campo, la enfermedad respiratoria provocada por el VNi en cerdos fue a menudo subclínica pero muy contagiosa en estos animales alojados en condiciones intensivas (Hooper *et al.*, 2001). Ello llevó a una diseminación rápida del virus entre la población porcina de Malasia y las autoridades optaron por el desvío como el principal medio para controlar la propagación (Nor *et al.*, 2000). Se eliminaron más de un millón de cerdos; alrededor de un 40% de los humanos infectados, la mayoría criadores de cerdos de Malasia y personal de mataderos de Singapur, que tuvieron contacto directo con cerdos vivos, murieron de encefalitis (Chua *et al.*, 2000). Un pequeño número de gatos, perros y caballos también resultó infectado en las explotaciones porcinas durante ese brote (Hooper *et al.*, 2001; Nor *et al.*, 2000), pero no fueron infecciones epidemiológicamente significativas.

Desde 2003, han tenido lugar brotes de la enfermedad por el VNi con una frecuencia casi anual en humanos de Bangladesh, y algunos en Bengala Occidental, región colindante con la India, y más recientemente en Kerala, en la costa oeste de la India (Arunkumar *et al.*, 2019). Se ha detectado como probable vía de transmisión desde los reservorios de animales salvajes a los humanos de los brotes de Bangladesh la ingesta de zumo natural de palmera datilera contaminado con la saliva, la orina o los excrementos de murciélagos frugívoros (Luby *et al.*, 2006). En algunos brotes, ha habido transmisión entre humanos. Como consecuencia de estos brotes constantes, se estima que hasta el momento han tenido lugar en Malasia, Singapur, Bangladesh y la India más de 600 casos de VNi en humanos, de los que han muerto más de 400.

En 2014, se notificó un brote de casos humanos de VNi en Filipinas, en el que murieron 9 de las 17 personas infectadas (Ching *et al.*, 2015). En este brote, los caballos enfermos fueron sacrificados y consumidos por personas que después contrajeron la infección. Se sospechó de alguna transmisión entre humanos. También resultaron infectados perros y gatos.

El diagnóstico de la enfermedad causada por los Henipavirus se realiza principalmente mediante la detección del ARN vírico en muestras clínicas o postmortem, y con el aislamiento del virus y la detección del antígeno vírico en muestras de tejidos (Daniels *et al.*, 2001). También puede ser útil la detección de anticuerpos específicos, particularmente en cerdos en los que la infección por el VNi puede pasar desapercibida. La identificación de anticuerpos anti-VHe en caballos es menos útil debido a la alta tasa de muerte por la infección en esta especie. Se han diagnosticado de forma retrospectiva infecciones humanas por el VHe y el VNi mediante serología. La detección de anticuerpos específicos frente al VHe o al VNi en animales y humanos es de importancia diagnóstica por tratarse de una infección muy infrecuente y por las graves implicaciones zoonóticas que tiene la transmisión de la infección.

El género henipavirus se está expandiendo, y recientemente se han identificado nuevos virus. El virus cedar se aisló de la orina de murciélagos *Pteropus* de Australia en 2009. Todavía no se sabe si puede pasar a otras especies, y en tal caso, causar enfermedad (Marsh *et al.*, 2012). Mediante PCR y secuenciación, se han detectado otros virus de tipo henipa en estado natural, pero todavía no se han aislado mediante las técnicas clásicas de aislamiento de virus (Wu *et al.*, 2014). Se han aislado dos virus tipo henipa de musarañas de Corea (Rep. de) (Lee *et al.*, 2021).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

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

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del 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 este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones;

+ = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa;

IHC = Inmunohistoquímica; IFA = Inmunofluorescencia indirecta; ELISA = enzimoimmunoanálisis;

VN = prueba de la neutralización del virus.

^(a)Se recomienda utilizar una combinación de métodos de identificación del agente con la misma muestra clínica

^(b)Los resultados positivos en ELISA y en la prueba de microesferas deben confirmarse con VNT a no ser que la prueba esté validada para este propósito.

1. Bioseguridad en el laboratorio

El VHe y el VNI son agentes patógenos peligrosos para el ser humano, causan una tasa de mortalidad alta y frente a ellos no existe vacuna ni tratamiento antivírico efectivo. El transporte de muestras sospechosas a los laboratorios y todas las manipulaciones de laboratorio que se realicen con cultivos víricos vivos (incluidas las pruebas serológicas como la neutralización del virus (VN) en las que se utilicen virus vivos) o material infectado o que pueda estarlo, como muestras de tejido o de sangre, debe realizarse a un nivel de bioseguridad y contención adecuado, que se establecerá en base a 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 de los animales). La seguridad de los trabajadores de laboratorio debe garantizarse aplicando una estrategia de gestión del riesgo biológico. Los laboratorios pueden adoptar distintas estrategias de gestión del riesgo biológico en función de si analizan muestras mediante PCR o intentan propagar agentes. Los métodos moleculares de detección del agente son preferibles como pruebas de primera línea porque acarrear menor riesgo para los trabajadores del laboratorio que el aislamiento del virus. Los laboratorios que no disponen de instalaciones de contención adecuadas para la manipulación de las muestras de casos sospechosos o para el trabajo con virus infecciosos deben utilizar los servicios de un laboratorio de referencia de la OIE u otros laboratorios especializados.

La propagación de virus, en concreto, debe realizarse en instalaciones de alta contención en unas condiciones estrictas que prevengan la infección accidental del personal de laboratorio. Durante el aislamiento primario del virus a partir de muestras obtenidas de casos sospechosos, debe tenerse en cuenta y reflejarse en los procedimientos que si aparece efecto citopático (ECP) “de tipo paramixovírico” en los cultivos infectados, el Nivel

de riesgo aumentará. Para que las directrices de bioseguridad sean adecuadas, deberán incluir la necesidad de trabajar aplicando unas buenas prácticas de laboratorio, el Nivel de contención, la clase de cabina de bioseguridad y el equipo de protección personal necesario. Para identificar la cepa y determinar si es un henipavirus, puede emplearse la RT-PCR o la detección por inmunofluorescencia del antígeno henipavirus en células fijadas con acetona. Para el transporte de cultivos a laboratorios especializados deben observarse las normas de transporte establecidas en el Capítulo 1.1.3 *Transporte de material biológico*.

2. Detección del agente

2.1. Aislamiento y caracterización del virus

El aislamiento del virus facilita enormemente los procedimientos de identificación, pero solo debe establecerse 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. Pueden emplearse técnicas moleculares de detección que no requieran la propagación de virus vivo para identificar la presencia de genoma vírico en las muestras. 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 los casos de animales vivos, siempre deben enviarse hisopos (nasales u orofaríngeos) de sangre y suero en EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). La orina, el encéfalo, los pulmones, los riñones y el bazo también son de utilidad, y pueden obtenerse si durante la extracción se observan las medidas de bioseguridad correspondientes. En los animales gestantes o en los casos de aborto, deben incluirse tejidos de aborto, útero, placenta y feto según corresponda. Las muestras deberán transportarse a 4°C si pueden llegar al laboratorio en un plazo máximo de 48 horas; si el transporte va a durar más de 48 horas, deberán enviarse congeladas sobre hielo seco o vapor de nitrógeno ($\approx -78,5^\circ\text{C}$). Las muestras no deben guardarse a -20°C .

Las muestras destinadas a las pruebas de diagnóstico se deberán enviar a los laboratorios correspondientes en recipientes diseñados especialmente para este fin, según se indica en el 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 tiene la ventaja de que tanto el VHe como el VNi crecen rápidamente en muchos cultivos celulares hasta alcanzar títulos altos. Se ha observado que las células de riñón de mono verde africano (Vero CCL181) y de riñón de conejo (RK-13) son especialmente susceptibles. El VHe también se replica en encéfalo de ratón lactante y en huevos de gallina embrionados, y los laboratorios que utilicen estos sistemas de aislamiento en la investigación de infecciones no diagnosticadas deberán tener en cuenta esta posibilidad.

En el laboratorio en que se lleve a cabo el aislamiento del virus, los tejidos deberán manipularse en condiciones de esterilidad, y se generarán suspensiones al 10% (p/v) triturando los tejidos en un sistema de homogeneización. Todos los procesos deberán llevarse a cabo en condiciones adecuadas, que vendrán determinadas por una evaluación del riesgo biológico. Los tubos empleados deberán disponer de anillas en O, y un hilo externo. Tras la clarificación del homogenado mediante una centrifugación en un rotor con tapa de seguridad, a 300 *g* durante 3–5 minutos y 4°C, se añade el sobrenadante a monocapas de células confluentes.

Habitualmente aparece un ECP en 3 días, pero se recomiendan dos pases de 5 días antes de estimar que el intento ha resultado infructuoso. Después de una baja multiplicidad de infección, el ECP se caracteriza por la formación de sincitios que, después de 24–48 horas, contienen en torno a 60 o más núcleos. Los sincitios formados por el VNi en las monocapas celulares Vero son

significativamente mayores que los creados por el VHe en el mismo periodo de tiempo. Aunque la distribución de núcleos en los sincitios inducidos por el VNi en la etapa temprana de la infección se parece a la inducida por el VHe, con agregación nuclear en el centro de los sincitios, los núcleos en los sincitios maduros inducidos por el VNi se distribuyen alrededor de la periferia 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 unas condiciones de laboratorio adecuadas para la gestión de los riesgos biológicos, las monocapas de células Vero o RK-13 cultivadas en cubreobjetos o en portas compartimentalizados se infectan con el virus aislado y se comprueba si las monocapas presentan sincitios después de un periodo de incubación de 24–48 horas a 37°C. Se recomienda que se analice un intervalo de diluciones del virus (no diluido, 1/10, 1/100) porque los sincitios se observan más fácilmente después de una infección a baja multiplicidad. Una vez que se detectan los sincitios, las células infectadas se fijan mediante inmersión en un recipiente lleno de acetona o de paraformaldehído. El recipiente se sella y su superficie se esteriliza antes de trasladarlo a un entorno de laboratorio donde los portas en los que el virus está ahora inactivado puedan secarse al aire. El antígeno vírico se detecta utilizando suero anti-VHe o anti-VNi y procedimientos inmunofluorescentes estándar. Un rasgo característico de los sincitios inducidos por los *Henipavirus* es la presencia de unas grandes estructuras poligonales que contienen el antígeno vírico que emiten fluorescencia.

ii) Microscopía inmunoelectrónica

Los altos títulos que se generan *in vitro* en las células por la presencia del VHe y del VNi permiten su visualización en el medio de cultivo mediante microscopía electrónica de contraste negativo sin necesidad de concentrar por centrifugación. La detección de interacciones virus-anticuerpo mediante microscopía inmunoelectrónica proporciona una información valiosa acerca de la estructura vírica y la reactividad antigénica, incluso durante el aislamiento primario del virus. Otras técnicas ultraestructurales permiten completar el examen diagnóstico, como el cultivo celular en rejilla (Hanna *et al.*, 2006), en el que las células se cultivan, se infectan y se visualizan sobre unas rejillas de microscopio electrónico, y la identificación de los virus replicándose y los cuerpos de inclusión en cortes finos de cultivos celulares fijados e incluidos y de tejidos infectados. Se han descrito los detalles de estas técnicas y su aplicación a la detección y el análisis del VHe y del 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).

2.2.3. Neutralización en placa de microtitulación

Para este procedimiento es necesario disponer de anti-suero específico del VHe y del VNi, así como de virus adaptados a cultivo celular. 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 DICT₅₀ 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 típicos 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 obtenidas para la PCR deben inactivarse como parte del procedimiento de extracción de ARN antes de realizar otras manipulaciones (PCR o secuenciación). En el Laboratorio de Referencia de la OIE se puede pedir consejo sobre estos procedimientos¹.

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

Para la detección primaria de henipavirus, se utiliza RT-PCR en tiempo real (véase la Tabla 2). Hay gran variedad de procedimientos y cebadores publicados, como el ensayo con el gen M del VHe-g2, que es ampliamente reactivo y detecta VHe-g1 y VHe-g2 (Wang *et al.*, 2021), mientras que el ensayo con el gen M de VHe-g1 es específico de Hendra-g1 (Smith *et al.*, 2001). El ensayo con el gen P de VHeP detecta tanto Hendra como Nipah (Feldman *et al.*, 2009).

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

Ensayo	Oligo	Nombre	Secuencia del cebador (5'–3')	Marcador de la sonda (5'–3')
Gen M de VHe-g1 (Smith <i>et al.</i> , 2001)	Directo	VHe M 5755F	CTT-CGA-CAA-AGA-CGG-AAC-CAA	
	Inverso	VHe M 5823R	CCA-GCT-CGT-CGG-ACA-AAA-TT	
	Sonda	VHe M 5778P	TGG-CAT-CTT-TCA-TGC-TCC-ATC-TCG-G	FAM-TAMRA
Gen M* de VHe-g2 (Wang <i>et al.</i> , 2021)	Directo	VHe-g2-M-F	CTG-ATC-TAC-GTT-ACG-GCA-AAC-CTT	
	Inverso	VHe-g2-M-R	GG-CCC-GCT-TCA-CCA-TCT-CTT-AC	
	Sonda	VHe-g2-M-P	CAG-CAT-TGA-ATA-TTG-ACC-CGC-CAG-TCA	FAM-BHQ1
	Directo	VHe-g2-N-F	TGC-GAC-AGA-TCC-CAG-TAG-TAT-TAA-AT	

1 Puede consultarse la dirección en la lista de los Laboratorios de Referencia: <https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>

Ensayo	Oligo	Nombre	Secuencia del cebador (5'-3')	Marcador de la sonda (5'-3')
Gen N de VHe-g2 (Wang et al., 2021)	Inverso	VHe-g2-N-R	GGC-AGC-TTA-TTC-GGC-AAA-AG	
	Sonda	VHe-g2-N-P	CTC-TGG-TGA-CGG-AAC-ACA-AAT-GCA-AAT-TTC	FAM-BHQ1
Gen P** de VHe (Feldman et al., 2009)	Directo	VHe_P_2698F	ACA-TAC-AAC-TGG-ACC-CAR-TGG-TT	
	Inverso	VHe_P_2794R	CAC-CCT-CTC-TCA-GGG-CTT-GA	
	Sonda	VHe_P_2721P	ACA-GAC-GTT-GTA-TAC-CAT-G	FAM-MGBNFQ
Gen N*** de VHe (Feldman et al., 2009)	Directo	VHe N119F	GAT-ATI-TTT-GAM-GAG-GCG-GCT-AGT-T	
	Inverso	VHe N260R	CCC-ATC-TCA-GTT-CTG-GGC-TAT-TAG	
	Sonda	VHe N198-220P	CTA-CTT-TGA-CTA-CTA-AGA-TAA-GA	FAM-MGBNFQ
Gen L**** de VNi (Wang no publicado)	Directo	VNi_L_11908F	GGT-ATG-ART-GTT-TTT-TGT-TTT-GGT-TTA-C	
	Inverso	VNi_L_11962R	CGG-CTT-TTG-YGA-ATT-CTT-GA	
	Sonda	VNi_L_11937P	ATC-AAA-ACA-GAG-ATG-CGA-GC	FAM-MGBNFQ

*El ensayo del gen M del VHe-g2 es ampliamente reactivo y detecta VHe-g1 y VHe-g2.

**El ensayo del gen P del VHe detecta VHe-g1 y VHe-g2, además de VNi, pero con una sensibilidad ligeramente inferior para VHe-g2.

***El ensayo del gen N de VHe detecta VHe-g1. Hay algunos fallos con VHe-g2, pero esta dificultad se supera cuando la carga vírica es alta.

****El ensayo del gen L de VNi detecta ambas cepas de 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 los ensayos en tiempo real cuando estos dan resultados inusuales o atípicos. También se utilizan para caracterizar los VHe detectados cuando se ha empleado 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	VHe M 5481F	GCC-CGC-TTC-ATC-ATC-TCT-T	300 pb
		Inverso	VHe M 5781R1	CCA-CTT-TGG-TTC-CGT-CTT-TG	
	PCR semi-anidada	Directo	VHe M 5481F	GCC-CGC-TTC-ATC-ATC-TCT-T	211 pb
		Inverso	VHe M 5691R2	TGG-CAT-CTT-TCA-TGC-TCC-ATC-TCG-G	
Gen P del VHe	PCR primaria	Directo	VHe P 4464F1	CAG-GAG-GTG-GCC-AAT-ACA-GT	335 pb
		Inverso	VHe P 4798R	GAC-TTG-GCA-CAA-CCC-AGA-TT	
	PCR semi-anidada	Directo	VHe P 4594F2	TCA-ACC-ATT-CAT-AAA-CCG-TCA-G	205 pb
		Inverso	VHe P 4798R	GAC-TTG-GCA-CAA-CCC-AGA-TT	

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

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 semianidada
 - 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, han descrito una PCR semianidada dirigida al gen L, que se muestra a continuación. Este ensayo detecta VNi-M y VNi-B, y también detectará el VHe.

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

Gen L de VNi	RT-PCR primaria	Directo	LFWD1	TGA GYA TGT ATA TGA AAG ATA AAG C	364 bp
		Inverso	LREV	TCA TCY TTA ACC ATC CCG TTC TC	
	PCR semianidada	Directo	LFWD2	ACC GAR CCA AGA TTG GT	266 bp
		Inverso	LREV	TCA TCY TTA ACC ATC CCG TTC TC	

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

- 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 semianidada
 - 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 OIE.

3.3. Detección del antígeno henipavirus en tejido fijado – inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una potente herramienta que permite visualizar el antígeno vírico dentro de las células y las estructuras 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 de henipavirus se replica en gran variedad de tipos celulares, como el endotelio, el músculo liso vascular, el parénquima pulmonar, los glomérulos renales, los cuerpos celulares de las neuronas, los tejidos linfoides o el tejido conjuntivo (Hooper *et al.*, 2001; Marsh *et al.*, 2011). Este antígeno es especialmente denso en los sincitios y en los macrófagos del interior de las lesiones. Por lo tanto, los tejidos adecuados para el diagnóstico de la infección por henipavirus son los pulmones, el encéfalo, los ganglios linfáticos, el bazo y los riñones. En ausencia de estos tejidos, merece la pena examinar cualquier otro tejido, puesto que ocasionalmente puede hallarse antígeno en cualquier punto del lecho vascular. A no ser que se disponga de indumentaria de protección y se implementen protocolos adecuados de desinfección, es más seguro obtener solo muestras de tejido mediante la técnica del “ojo de cerradura” a partir de casos sospechosos. El tejido pulmonar y el de los ganglios linfáticos submandibulares son buenos candidatos a este tipo de muestreo.

Los antisueros policlonales generados en conejo contra la nucleoproteína de henipavirus recombinantes son muy fiables como anticuerpos primarios para el diagnóstico mediante inmunohistoquímica. La detección de fosfoproteína como antígeno también resulta adecuada a efectos del diagnóstico, aunque esta tiende a expresarse menos que la nucleoproteína. También pueden utilizarse otros sistemas comerciales secundarios de detección. El siguiente es un ejemplo de un procedimiento de inmunohistoquímica en el que se emplea un sistema de inmunoperoxidasa y cromagen AEC. Pueden emplearse otros métodos, que presentarán ligeras variaciones en función de las enzimas y de los cromógenos.

3.3.1. Procedimiento analítico

- i) Se procesan los tejidos fijados según los procedimientos histológicos habituales en bloques de parafina, y se realizan cortes sobre portaobjetos. Se corta el control positivo y el negativo, según corresponda.
- ii) Se desparafinan los portas mediante inmersión en tres baños de xileno consecutivos, 3 minutos en cada uno. Se hidratan los cortes mediante dos cambios de etanol al 98–100%, un cambio de etanol al 70% y agua de grifo para eliminar el alcohol residual.
- iii) El antígeno se puede recuperar calentando en un tampón citrato (pH 9) durante 20 minutos a 97°C, o con digestión mediante proteinasa durante 5 minutos.
- iv) Llegado este punto, y entre un paso y el siguiente a partir del paso vii, se lavan los portas en tampón TRIS (pH 7,6) varias veces.
- v) En esta fase, se bloquea el compuesto endógeno. Ello dependerá del sistema de detección empleado; por ejemplo, si se utiliza un sistema de inmunoperoxidasa, la peroxidasa endógena tendrá que bloquearse con H₂O₂ acuoso al 3% durante 10 minutos.
- vi) Se añade el anticuerpo primario, a una dilución previamente caracterizada, durante 45 minutos.
- vii) Se añade el conjugado de anticuerpo secundario. Existen muchos sistemas: el más sencillo y robusto consiste en un solo paso. Para utilizarlo correctamente, consúltense las instrucciones del fabricante del producto.
- viii) Se añaden el cromagen (por ejemplo, 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), o 3,3' diamino-benzidina (DAB) durante 10 minutos. Para utilizarlo correctamente, consúltense las instrucciones del producto.
- ix) Se lava en agua destilada para detener la aparición de color.
- x) Se aplica una tinción de contraste en hematoxilina durante 30 segundos a 3 minutos (según el tipo de tinción).
- xi) Se enjuaga en agua de grifo. Se añade la solución de Scott (bicarbonato de sodio 0,04 M, sulfato de magnesio 0,3 M) durante 1 minuto y se lava bien en agua de grifo.
- xii) Se monta con un cubreobjetos empleando medio de montaje acuoso.
- xiii) El antígeno vírico se puede visualizar porque se tife de marrón/rojo, aunque el color dependerá del cromagen que se haya 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 donde se realizan las pruebas serológicas, en concreto en situaciones de brote, se han adoptado diversas estrategias para reducir el riesgo de exposición del personal de laboratorio al VHe y al VN_i. Los sueros recibidos de un brote de sospecha 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 polisorbato 20 y etoxilato de octilfenol al 0,5%, e inactivarse por calor a 56°C durante 30 minutos antes de la prueba. El procedimiento utilizado se fundamentará en una evaluación de riesgos. Puede considerarse que las muestras utilizadas en las pruebas de vigilancia y las de certificación de los desplazamientos de animales entrañan un menor peligro biológico que las pruebas que se utilizan para investigar la enfermedad durante un brote. En algunas circunstancias, puede adaptarse la inactivación por calentamiento como medida suficiente de precaución. Sin embargo, es preferible utilizar un enfoque estandarizado para todas las muestras durante la ejecución de una prueba a mantener varios métodos analíticos.

En Australia, la introducción de la vacunación equina contra el virus Hendra ha influido en los posibles objetivos analíticos de las pruebas de detección de los anticuerpos contra la proteína G. Estas pruebas pueden utilizarse para detectar las respuestas inmunitarias a la vacunación, de tal forma que, si se ha utilizado la vacuna, la detección de anticuerpos ya no indica necesariamente una infección previa. Al interpretar los resultados de las pruebas serológicas debe tenerse en cuenta la posibilidad de que los animales hayan sido vacunados.

4.1. Pruebas de neutralización del virus

La prueba de neutralización vírica (VN) se acepta como método de referencia. La más utilizada es la prueba en placas de microtitulación, que debe realizarse en condiciones adecuadas de gestión del riesgo biológico. Los sueros problema se incuban con VHe o el VN_i en las placas de microtitulación de 96 pocillos antes de añadir las células Vero. Estos sueros se analizan empezando con una dilución a 1/2 aunque esto puede acarrear problemas de citotoxicidad inducida por el suero. En el caso de muestras de baja calidad o volúmenes pequeños de muestra, como puede ser el caso de sueros de zorro volador o de murciélago carnívoro, puede utilizarse una dilución inicial al 1/5. Los cultivos se leen a los 3 días y aquellos sueros que bloqueen completamente el desarrollo del ECP se designarán como positivos para los anticuerpos. En el caso de problemas de citotoxicidad, el inmunoanálisis en placas (Crameri *et al.*, 2002) tendría una ventaja, porque las mezclas virus/suero se extraen de las monocapas de células Vero después del periodo de adherencia, de modo que se reduce su toxicidad. Los resultados de la VN se consideran positivos si se observa neutralización del virus en cualquiera de las diluciones que se utilizan en la prueba. Si se encuentran anticuerpos neutralizantes tanto para el VHe como para el VN_i, el título >al cuádruple se considera el positivo, y si los títulos difirieran en menos del cuádruple el suero se consideraría positivo para un henipavirus inespecífico. Para el caso de los laboratorios que no disponen de instalaciones de bioseguridad adecuadas, se ha descrito una prueba de neutralización en la que se emplea un virus de la estomatitis vesicular pseudotipificado que expresa una proteína mediante fluorescencia verde (Kaku *et al.*, 2009).

4.2. Enzimoimmunoanálisis

Los antígenos de los Henipavirus obtenidos en cultivos de tejidos para las pruebas de enzimoimmunoanálisis (ELISA) se irradian con 6 kilograys antes de su uso, un tratamiento que tiene un efecto insignificante sobre el título antigénico. En el ELISA indirecto desarrollado en respuesta al brote inicial de Hendra de 1994, se obtuvo antígeno a partir de células infectadas por el VHe sometidas a varios ciclos de congelación y descongelación y tratamiento con dodecilsulfato sódico al 0,1% (p/v). Ahora, una forma soluble recombinante expresada de proteína G de virus Hendra (Bossart *et al.*, 2005) es el antígeno de elección y su uso ha permitido la mejora de inmunoensayos de detección del virus 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 contra el VHe para su uso en caballos (McNabb *et al.*, 2021). El ELISA MAC de IgM del VHe está destinado a complementar los resultados de otras pruebas moleculares y serológicas, con un uso selectivo, y es la única prueba serológica que puede proporcionar una indicación de infección reciente.

En el programa nacional de vigilancia porcina de Malasia de 1999 se empleó un formato de ELISA indirecto similar en el que el antígeno procedía de células infectadas por el VN_i tratadas con un detergente no iónico. Posteriormente, para controlar los Niveles altos de actividad de unión inespecífica

en algunos antisueros porcinos, se desarrolló un ELISA modificado basado en la reactividad relativa de sueros con el antígeno del VN_i y un antígeno control derivado de células Vero no infectadas. Para el VN_i, también se ha descrito (Yu *et al.*, 2006) un ELISA en el que se utiliza antígeno recombinante de la nucleocápsida, y que está configurado para la detección de la IgG o la IgM.

El enfoque actual es analizar mediante VN todos los sueros que den positivo en el ELISA, siendo considerados positivos los sueros que también den positivo en la VN. La confirmación mediante la VN debe hacerse en unas condiciones en que los riesgos de trabajar con el virus vivo se puedan controlar adecuadamente, lo que puede implicar el envío de las muestras a un laboratorio reconocido a nivel internacional, que cuente con procedimientos normalizados para este tipo de trabajo.

El procedimiento ELISA para el VN_i que se indica a continuación se ha desarrollado en el Laboratorio de Salud Animal de Australia (AAHL) para sueros porcinos y se ha estandarizado después de los estudios realizados en colaboración con el Instituto de Investigación Veterinaria de Ipoh, Malasia.

4.2.1. Método de I-ELISA (indirecto) para sG de virus Hendra con suero de caballo– procedimiento analítico

Se ha utilizado una forma soluble expresada recombinante de la proteína G de Hendra (Bossart *et al.*, 2005) en el ensayo de elección. El ELISA indirecto para la proteína G soluble de Hendra eliminó casi todos los falsos positivos del ELISA indirecto para el VHe utilizado anteriormente, que utilizaba una preparación vírica cruda de SDS (dodecil sulfato de sodio), con una sensibilidad relativa marginalmente baja (Colling *et al.*, 2018). La solidez del ensayo se evaluó en paneles de pruebas interlaboratorio y de competencia (Colling *et al.*, 2018). Este ensayo se considera adecuado para la vigilancia serológica y el transporte internacional de caballos cuando se utiliza la neutralización del virus para las pruebas de seguimiento de las muestras de suero positivas o no concluyentes.

i) Método del I-ELISA

- a) Se recubre una placa de 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) Se procede al paso c o se sella la placa con cinta adhesiva y se conserva a 4°C (no más de una noche).
- c) Se bloquea la placa añadiendo 50 µl/pocillo de tampón de bloqueo (leche desnatada en polvo [LDP] en PBS A) (en este paso no se enjuaga).
- d) Se incuba durante 30–60 minutos más a 37°C en un agitador de placas.
- e) Se enjuaga la placa 4x con PBS que contenga polisorbato 20 al 0,05% (PBST) empleando un enjuagador de placas.
- f) Se diluyen los sueros problema y los controles a 1/100 en diluyente de ELISA (LDP al 1% en PBST) y se añaden 50 µl/pocillo. Nota: se diluyen las muestras a 1/20 si se han tratado con etoxilato de octilfenol/polisorbato 20.
- g) Se incuban durante 1 hora a 37°C en un agitador de placas, y se cubren con sellador de placas.
- h) Se enjuaga la placa 4x con PBST utilizando un enjuagador de placas.
- i) Se añaden anticuerpos equinos conjugados a peroxidasa de rábano diluidos a 1/5000 en diluyente de ELISA (LDP al 1% en PBST).
- j) Se incuban durante 30 minutos a 37°C en un agitador de placas, y se cubren con sellador de placas.
- k) Se lavan las placas 4x con PBST utilizando enjuagador de placas
- l) Se añaden 50 µl/pocillo de cromógeno TMB (tetrametilbencidina)/sustrato y se incuba a temperatura ambiente durante 7-10 minutos.
- m) Se detiene la reacción con 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 1 M.

n) Se lee la densidad óptica a 450 nm en un lector de placas.

Transformación de los datos: Se calculan los valores medios de DO para los resultados de la muestra problema y del 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 una relación señal/positivo (S/P) del suero medio de baja positividad (C+).

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

ii) Criterios de aceptación

La prueba es 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 inconcluyentes y se necesita una VN para aclarar el resultado. Las muestras con S/P > 0,4 se consideran positivas y se necesita 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 que la G soluble está presente en la actual vacuna contra el virus Hendra). Cualquier resultado positivo debe interpretarse en el contexto del historial de vacunación del caballo. Además, este ensayo sólo puede utilizarse con suero de caballo debido a que en el ELISA se utilizan anticuerpos equinos conjugados a peroxidasa de rábano.

4.2.2. Método del ELISA de bloqueo (B-ELISA) para virus Hendra

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

i) Método del B-ELISA

- Se realiza un pretratamiento de sueros con etoxilato de octilfenol/polisorbato 20 (dilución a 1/5 en PBS que contenga etoxilato de octilfenol al 0,5% [v/v] y polisorbato 20 al 0,5% [v/v]).
- Se recubren placas de ELISA duras de fondo plano de microtitulación de 96 pocillos con 50 µl/pocillo de antígeno G soluble del virus Hendra en PBS, equivalente a 4,4 ng. Se incuban a 37°C durante 1 hora en agitador de placas.
- se bloquean las placas añadiendo 50 µl de diluyente de ELISA (tampón de bloqueo 1x) directamente a los pocillos sin lavar la placa. Se pone la placa en el agitador de placas durante 30 minutos a 37°C.
- Se lavan las placas 3 × con PBST.
- Se diluye el suero (30 µl de suero + 120 µl de tampón de bloqueo) y se añaden 50 µl por pocillo. Si se utilizan muestras tratadas con etoxilato de octilfenol/polisorbato 20, se añaden 50 µl directamente a los pocillos. Se pone en un agitador de placas durante 1 hora a 37°C.
- Se añade anticuerpo monoclonal (MAb) 1.2 diluido en tampón de bloqueo a razón de 50 µl por pocillo. No se añade MAb a los pocillos blanco. Se pone en agitador de placas durante 1 hora a 37°C.
- Se lavan las placas 3 × con PBST.

- h) Se añade conjugado diluido (anticuerpos murinos conjugados a peroxidasa de rábano) en tampón de bloqueo a razón de 50 µl por pocillo.
- i) Se lavan las placas 3 × con PBST.
- j) Se añaden 50 µl de cromógeno TMB/sustrato. Aparece color en 7–10 minutos.
- k) Se añaden 50 µl de solución de parada (ácido sulfúrico 1 M) a los pocillos.
- l) Se lee con un lector de placas a 450 nm en un plazo máximo de 5 minutos tras la parada.

Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición (PI) respecto a la DO media de los sueros control negativos:

$$PI = \{100 \times (1 - [DO problema_{MEDIA} / DO CONTROL NEG_{MEDIA}])\}$$

ii) Interpretación de los resultados

Si el PI del 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 con 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 que la G soluble está presente en la actual vacuna contra el virus de Hendra utilizada en los caballos). Cualquier resultado positivo debe interpretarse en el contexto del historial de vacunación del animal.

El siguiente procedimiento de ELISA para el VN_i 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 de Ipoh, Malasia. Se han publicado otros protocolos ELISA para el diagnóstico de henipavirus en cerdos.

4.2.3. ELISA indirecto para virus Nipah (NiV I-ELISA) para uso con suero porcino

En el Laboratorio de Referencia de la OIE se dispone de la metodología detallada para la producción y/o suministro de los antígenos de VN_i irradiado y células Vero no infectadas.

- i) Preparación de los sueros problema
 - a) Las muestras de sangre deben prepararse, antes de la centrifugación, en una cabina de seguridad biológica de clase II, con equipo de protección personal adecuado, o en una cabina de clase III.
 - b) Se diluye a 1/5 el suero problema en PBS que contenga etoxilato de octilfenol al 0,5% (v/v) y polisorbato 20 al 0,5% (v/v) en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se sella la placa de microtitulación. El personal de laboratorio debe usar batas y guantes y rociarse ambas manos, al igual que la placa de microtitulación sellada, con un desinfectante adecuado antes de extraer la placa de microtitulación de la cabina de bioseguridad para calentarla a 56°C durante 30 minutos.
 - c) Se mezclan 22,5 µl del suero inactivado por calor con un volumen igual de antígeno de células Vero no infectadas diluido a 1/100 en PBS. Se mezcla a fondo y se incuba a 18–22°C durante 30 minutos.
 - d) Se añaden 405 µl de solución de bloqueo (PBS que contenga un 5% de suero de pollo y un 5% de leche desnatada en polvo -LDP-al 5%) hasta alcanzar una dilución final del suero al 1/100 y se incuba a 18–22°C durante 30 minutos. Se añaden alícuotas de 100 µl a dos pocillos que contengan el antígeno del VN_i y a dos pocillos que contengan el antígeno control, células Vero no infectadas, como se describe en el paso ii) *Método de ELISA*, abajo.

ii) Método de ELISA

- a) Se diluyen las células Vero control y los antígenos del VNi en PBS para asegurar que los pocillos control y de antígeno vírico se cubren paralelamente y con una concentración similar de proteína. Normalmente el antígeno se diluye desde 1/1.000 a 1/4.000 pero debe determinarse un factor de dilución específico para cada lote de antígeno. Se añaden 50 µl de antígeno vírico y antígeno celular control a los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos, como se indica seguidamente: antígeno vírico en las columnas 1, 3, 5, 7, 9 y 11 y antígeno celular control en las columnas 2, 4, 6, 8, 10 y 12. Se incuban a 37°C durante 1 hora con agitación. También se pueden incubar las placas durante toda la noche a 4°C.
- b) Se lavan las placas ELISA tres veces con PBS que contenga polisorbato 20 al 0,5% (PBST) (250 µl/pocillo) y se bloquean con PBS que contenga un 5% de suero de pollo y un 5% de LDP (100 µl/pocillo) durante 30 minutos a 37°C en un agitador.
- c) Se lavan las placas tres veces con PBST y se añaden 100 µl de los sueros absorbidos inactivados procedentes de la etapa i) *Preparación de sueros problema*, arriba, a cada pocillo. Se añaden 100 µl de PBS que contenga un 5% de suero de pollo y un 5% de LDP a los pocillos del conjugado y del sustrato control. Se incuban las placas sin agitación durante 1 hora a 37°C y se lavan tres veces con PBST.
- d) Se diluye el conjugado de proteína A/G-peroxidasa de rábano en PBST que contenga leche desnatada en polvo al 1% (p/v). El factor de dilución es aproximadamente de 1/50.000. Después de mezclar bien, se añaden 100 µl de proteína A-conjugado a todos los pocillos a excepción de los del sustrato control. Se añaden 100 µl de PBST que contenga un 1% de LDP a los pocillos de sustrato control. Se incuban las placas durante 1 hora a 37°C sin agitación y se lavan cuatro veces con PBST.
- e) Se prepara el cromógeno/sustrato (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina; TMB) disolviendo un comprimido (1 mg) en 10 ml de tampón citrato fosfato 0,05 M, pH 5,0 y se añaden 2 µl de H₂O₂ al 30% (v/v) fresco. Se añaden 100 µl del sustrato TMB a cada pocillo. Se incuban durante 10 minutos a 18–22°C y se para la prueba mediante la adición a cada pocillo de 100 µl de ácido sulfúrico 1 M.
- f) Se leen las placas tras realizar una lectura de un blanco que consistirá en un pocillo de sustrato control. Se utilizan las densidades ópticas (OD) a 450 nm del pocillo con el antígeno del VNi y del pocillo con el antígeno control de las células Vero para calcular una ratio OD para cada suero (OD del antígeno del VNi/OD del antígeno control Vero).

iii) Interpretación de los resultados

Las muestras con valores de DO para el antígeno VNi inferiores a 0,20 son negativas, mientras que aquellas que den valores de DO para el antígeno VNi superiores a 0,20 se evaluarán mediante el cociente entre la DO para el antígeno y la DO para el control, del siguiente modo:

- a) un cociente de DO >2,0 se considerará positivo
- b) un cociente de DO de entre 2,0 y 2,2 deberán considerarse inconcluyente

Los sueros inconcluyentes y los positivos deberán analizarse mediante neutralización vírica para confirmar o aclarar un resultado.

4.3. Pruebas con microesferas

Una ventaja del uso de ensayos basados en microesferas es que el suero puede ser analizado para los anticuerpos del virus Hendra y Nipah en el mismo pocillo usando un experimento en lugar de múltiples pruebas (ELISA y NV) como validaron McNabb *et al.* (2014). Los siguientes métodos, validados, son ejemplos de este tipo de pruebas.

Se han desarrollado dos pruebas serológicas con microesferas multiplexadas empleando la tecnología de las microesferas magnéticas que permiten la identificación de anticuerpos contra el VHe y el VNi en un solo ensayo (McNabb *et al.*, 2014). Ambas pruebas miden los anticuerpos contra la glucoproteína

soluble recombinante expresada (sG) del VHe y del VNi. Una mide los anticuerpos que se unen directamente a la sG (prueba de unión) y la otra mide la capacidad que tienen los anticuerpos de bloquear el receptor del henipavirus EphrinB2 mediante unión a la sG (prueba de bloqueo). En primer lugar, las proteínas recombinantes de la sG del VHe o del VNi se unen a microesferas magnéticas identificables individualmente. A continuación, las microesferas con la proteína unida se mezclan con los sueros problema. En el caso de la prueba de unión, a continuación, los sueros con proteína unida se someten a análisis empleando un conjugado secundario de proteína A/G biotinilada y Estreptavidina-ficoeritrina (S-PE). En el caso de la prueba de bloqueo, los sueros deben competir con el ephrinb2 biotinilado para la unión a la sG, y también en este caso se utiliza S-PE para cuantificar la reacción. A continuación, las microesferas se examinan mediante láser en un sistema de inmunoensayo múltiple con microesferas y los resultados se registran como la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) de 100 microesferas. De forma similar a lo que ocurre con el ELISA, los sueros que se sospeche que son negativos deberán analizarse mediante VN.

4.3.1. Procedimiento de unión a las microesferas

- i) Activación de las microesferas
 - a) Se deja atemperar el tampón de activación de las microesferas (NaH_2PO_4 0,1 M, pH 6,2) a temperatura ambiente antes de utilizarlo.
 NOTA: Las microesferas deben protegerse de la luz porque se las destiñe (los tubos deben cubrirse con papel de aluminio siempre que sea posible).
 - b) Se escogen microesferas carboxiladas magnéticas (que se suministran a razón de $1,25 \times 10^7$ microesferas/ml) para la reacción de unión a proteína del virus en cuestión (VHe o VNi). Se someten a vórtex durante 30 segundos a velocidad media, y a continuación se sonicán con una sonicación en baño durante ~30–60 segundos. Es importante resuspender por completo las microesferas en forma de partículas monodispersas individuales.
 - c) Se transfieren 300 μl de microesferas carboxiladas magnéticas ($3,75 \times 10^6$ microesferas) a microtubos con tapón de rosca de 2 ml. Se sitúan los tubos en un separador magnético y se deja que tenga lugar la separación durante 30–60 segundos. Con los tubos aun situados en el separador magnético, se retira el sobrenadante con una pipeta, con cuidado de no perturbar el precipitado de microesferas.
 - d) Se lavan las microesferas añadiendo 300 μl de PBS-T a los tubos y sometiéndolos al vórtex. Se sitúan los tubos en un separador magnético y se deja que tenga lugar la separación durante 30–60 segundos. Con los tubos aun situados en el separador magnético, se retira el sobrenadante con una pipeta, con cuidado de no perturbar el precipitado de microesferas. Se repite la operación.
 - e) Se añaden 600 μl de tampón de activación de las microesferas a los tubos, y se someten a vórtex. Se sitúan los tubos en un separador magnético y se deja que tenga lugar la separación durante 30–60 segundos. Con los tubos aun situados en el separador magnético, se retira el sobrenadante con una pipeta, con cuidado de no perturbar el precipitado de microesferas. Se repite la operación
 - f) Se añaden 240 μl de tampón de activación de las microesferas a los tubos, se cubren con papel de aluminio y se agitan durante 3 minutos.
 - g) Preparar los reticulantes (1-etil-3-[3-dimetilamino-propil] carbodiimida [EDC] = un reticulante de longitud cero reactivo a los carboxilos y aminas, y S-NHS = sulfo-N-hidroxisulfosuccinimida) en tampón de activación de microesferas inmediatamente antes de su uso a una concentración de 50 mg/ml (20 μl tampón/mg de polvo). Se añaden 30 μl de EDC 50 mg/ml acabado de preparar a los tubos, y enseguida 30 μl de S-NHS 50 mg/ml acabado de preparar. NOTA: Se desecha la parte no utilizada y se vuelve a preparar cada vez.
 - h) Se tapan los tubos con papel de aluminio y se agitan las microesferas a temperatura ambiente durante 20 minutos.

- i) Durante la incubación de las microesferas, se preparan las proteínas de la sG. Se utilizan 90 µg de sG de VHe y 90 µg de sG de VNi, y PBS (no debe utilizarse PBS-T, porque bloquea los grupos carboxi) para lograr un volumen final de proteína de 300 µl.
 - j) Tras la incubación, las microesferas están activadas y listas para la unión. Se sitúan los tubos en un separador magnético y se deja que tenga lugar la separación durante 30–60 segundos. Con los tubos aun situados en el separador magnético, se retira el sobrenadante con una pipeta, con cuidado de no perturbar el precipitado de microesferas.
- ii) Unión de la proteína
- a) Se lavan las microesferas añadiendo 300 µl de PBS a los tubos y sometiéndolos a vórtex (no debe utilizarse PBS-T, porque bloquea los grupos carboxi). Se sitúan los tubos en un separador magnético y se deja que tenga lugar la separación durante 30–60 segundos. Con los tubos aun situados en el separador magnético, se retira el sobrenadante con una pipeta, con cuidado de no perturbar el precipitado de microesferas.
 - b) Se añaden los 300 µl de la proteína preparada, como se explica arriba, a las microesferas activadas.
 - c) Se tapan los tubos con papel de aluminio y se agitan las microesferas moderadamente a temperatura ambiente durante 2 horas.
 - d) Ahora la proteína está unida a las microesferas. Se sitúan los tubos en un separador magnético y se deja que tenga lugar la separación durante 30–60 segundos. Con los tubos aun situados en el separador magnético, se retira el sobrenadante con una pipeta, con cuidado de no perturbar el precipitado de microesferas.
 - e) Se lavan las microesferas dos veces con 300 µl de PBS-T como se ha descrito arriba. Se sitúan los tubos en un separador magnético y se deja que tenga lugar la separación durante 30–60 segundos. Con los tubos aun situados en el separador magnético, se retira el sobrenadante con una pipeta, con cuidado de no perturbar el precipitado de microesferas.
 - f) Se resuspenden las microesferas unidas en 1,8 ml de tampón para almacenamiento de microesferas (10 ml de PBS, BSA al 1%, azida sódica al 0,05% y 1 comprimido de inhibidor de proteasa (Roche) y se almacenan a 4°C.

NOTAS: Se comprueba la reactividad de la sG con sueros que contengan henipavirus. Se utiliza 1 µl de microesferas unidas por pocillo para la unión a los henipavirus y para las pruebas serológicas de bloqueo (este procedimiento une suficientes microesferas como para analizar alrededor de 1800 sueros). Las microesferas unidas pueden guardarse a 4°C durante al menos 1 año sin que pierdan reactividad.

4.3.2. Procedimiento de la prueba de unión para Henipavirus

- i) Método analítico
 - a) Se escogen microesferas previamente unidas a sG de VHe y de VNi. Se someten a vórtex estas esferas durante 30 segundos a velocidad máxima, y a continuación se sonicán mediante sonicación en baño durante ~30–60 segundos.
 - b) Se diluyen las microesferas en bloqueador (leche desnatada al 2% en PBS-T) a una concentración adecuada para el número de sueros a analizar (1 µl de microesferas unidas a sG de VHe y 1 µl de microesferas unidas a sG de VN/por pocillo).
 - c) Se añaden 100 µl de microesferas diluidas a los pocillos correspondientes de una placa de fondo plano de 96 pocillos.
 - d) Se tapa la placa con papel de aluminio y se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos sobre un agitador de placas.
 - e) Se sitúa la placa en un soporte magnético y se deja que tenga lugar la separación durante 30–60 segundos. Con la placa aun situada en el soporte magnético, se golpea

el contenido para que se hunda y se seca suavemente sobre papel absorbente, retirando la placa del soporte magnético.

- f) Se lava dos veces con PBST o, como alternativa, se utiliza un lavador magnético automático de placas.
- g) Se añaden 100 µl de suero control y 100 µl de suero problema a 1/100 en PBS-T a los pocillos (los sueros de murciélago se diluyen a 1/50).

NOTA: Antes de ser analizados, todos los sueros deben inactivarse por calor sometiéndolos durante 35 minutos a 56°C.

- h) Se cubre la placa con papel de aluminio y se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos sobre un agitador de placas.
- i) Se sitúa la placa en un soporte magnético y se deja que tenga lugar la separación durante 30–60 segundos. Con la placa aun situada en el soporte magnético, se golpea el contenido para que se hunda y se seca suavemente sobre papel absorbente, retirando la placa del soporte magnético.
- j) Se lava dos veces con PBST o, como alternativa, se utiliza un lavador magnético automático de placas.
- k) Se diluye la proteína A biotinilada a 1/500 (2 µg/ml) y la proteína G biotinilada a 1/250 (2 µg/ml) en el mismo tubo en PBS-T y se añaden 100 µl a los pocillos.
- l) Se tapa la placa con papel de aluminio y se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos sobre un agitador de placas
- m) Se sitúa la placa en un soporte magnético y se deja que tenga lugar la separación durante 30–60 segundos. Con la placa aun situada en el soporte magnético, se golpea el contenido para que se hunda y se seca suavemente sobre papel absorbente, retirando la placa del soporte magnético
- n) Se lava dos veces con PBST o, como alternativa, se utiliza un lavador magnético automático de placas.
- o) Se añaden a los pocillos 100 µl de Estreptavidina R-PE diluida a 1/1000 (1 µg/ml) en PBS-T.
- p) Se tapa la placa con papel de aluminio y se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos sobre un agitador de placas.
- q) Se lee la placa empleando un sistema de inmunoensayo múltiple con microesferas y software.

ii) Interpretación de los resultados

Los resultados se pueden interpretar a partir de los valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) o bien transformando estos valores en un porcentaje respecto a la MFI del control positivo (%P) empleando la siguiente formula:

$$(MFI \text{ suero problema} / MFI \text{ control positivo}) \times 100$$

La muestra que de una MFI > 1500 o un %P >5 debe volver a analizarse en la prueba de unión. Si sigue siendo positiva, deberá analizarse de nuevo mediante VN para confirmar el resultado.

4.3.3. Procedimiento de la prueba de bloqueo para Henipavirus

i) Método analítico

- a) Se escogen microesferas previamente unidas a sG de VHe y de VNi. Se someten a vórtex estas esferas durante 30 segundos a velocidad máxima, y a continuación se sonicán mediante sonicación en baño durante ~30–60 segundos

- b) Se diluyen las microesferas en bloqueador (leche desnatada al 2% en PBS-T) a una concentración adecuada para el número de sueros a analizar (1 µl de microesferas unidas a sG de VHe y 1 µl de microesferas unidas a sG de VN/por pocillo).
- c) Se añaden 100 µl de microesferas diluidas a los pocillos correspondientes de una placa de fondo plano de 96 pocillos.
- d) Se tapa la placa con papel de aluminio y se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos sobre un agitador de placas.
- e) Se sitúa la placa en un soporte magnético y se deja que tenga lugar la separación durante 30–60 segundos. Con la placa aun situada en el soporte magnético, se golpea el contenido para que se hunda y se seca suavemente sobre papel absorbente, retirando la placa del soporte magnético.
- f) Se lava dos veces con PBST o, como alternativa, se utiliza un lavador magnético automático de placas.
- g) Se añaden a los pocillos 100 µl de suero control y 100 µl de suero problema diluido a 1/50 en PBS-T (los sueros de murciélago se diluyen a 1/25).

NOTA: Antes de ser analizados, todos los sueros deben inactivarse por calor sometiéndolos durante 35 minutos a 56°C

- h) Se cubre la placa con papel de aluminio y se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos sobre un agitador de placas
- i) Se sitúa la placa en un soporte magnético y se deja que tenga lugar la separación durante 30–60 segundos. Con la placa aun situada en el soporte magnético, se golpea el contenido para que se hunda y se seca suavemente sobre papel absorbente, retirando la placa del soporte magnético
- j) Se lava dos veces con PBST o, como alternativa, se utiliza un lavador magnético automático de placas
- k) Se diluye dphrinB2 biotinilado a 1/1000 (50 µg/ml) en PBS-T y se añaden 100 µl a los pocillos.
- l) Se tapa la placa con papel de aluminio y se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos sobre un agitador de placas
- m) Se sitúa la placa en un soporte magnético y se deja que tenga lugar la separación durante 30–60 segundos. Con la placa aun situada en el soporte magnético, se golpea el contenido para que se hunda y se seca suavemente sobre papel absorbente, retirando la placa del soporte magnético
- n) Se lava dos veces con PBST o, como alternativa, se utiliza un lavador magnético automático de placas
- o) Se añaden a los pocillos 100 µl de Estreptavidina R-PE diluida a 1/1000 (1 µg/ml) en PBS-T.
- p) Se tapa la placa con papel de aluminio y se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos sobre un agitador de placas.
- q) Se lee la placa empleando un sistema adecuado de inmunoensayo múltiple con microesferas y software.

ii) Interpretación de los resultados

Para la prueba de bloqueo, las lecturas de MFI se convierten en porcentaje de inhibición (%) empleando la siguiente formula: $(1 - [\text{MFI del suero problema}/\text{MFI del suero negativo}]) \times 100$

La muestra que dé un % >15 deberá volver a analizarse en la prueba de bloqueo. Si sigue siendo positiva, deberá analizarse de nuevo mediante VN para confirmar el resultado.

4.4. DIVA

En el *Australian Centre for Disease Preparedness* se utiliza un ensayo DIVA para ayudar a distinguir entre los caballos infectados por el virus de Hendra y los caballos que han sido vacunados con la vacuna G soluble de Hendra. Actualmente está en proceso de validación (póngase en contacto con el Laboratorio de Referencia de la OIE para más detalles).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

El primer brote de VNI de Malasia y Singapur se vincula a la transmisión del virus de los cerdos a las personas, y todas las infecciones humanas por el virus Hendra de Australia se han vinculado al contacto con caballos enfermos. La aparición de vacunas veterinarias contra los henipavirus es importante tanto para proteger a especies animales domésticas susceptibles (es decir, los cerdos, los équidos, los gatos y los perros), como para reducir la transmisión entre animales y personas. Este fue el motivo por el que se desarrolló la vacuna contra el VHe, de la que actualmente se dispone en Australia para su uso en caballos. No existe ninguna vacuna aprobada para la prevención del VHe en humanos.

2. Vacuna preparada con la subunidad soluble de la glicoproteína G de henipavirus

Un estudio preliminar realizado con el VHe en hurones (Pallister *et al.*, 2011) aportó pruebas sólidas de que una vacuna basada en la subunidad de la glicoproteína soluble del VHe (HeVsG) podría prevenir la enfermedad en animales expuestos a una dosis de VHe que de otro modo sería letal. La glicoproteína G expresada en la superficie del henipavirus tiene la función crítica de iniciar la infección al unirse a los receptores de las células del huésped, y los anticuerpos dirigidos contra esta proteína pueden neutralizar el virus. El fabricante de la vacuna ha formulado una vacuna contra el virus de Hendra para caballos utilizando HeVsG y un adyuvante patentado. La vacuna, lanzada en Australia en noviembre de 2012, sólo está disponible para su administración por parte de veterinarios registrados. Para la inmunización primaria deben administrarse dos dosis de la vacuna con un intervalo de 3 a 6 semanas en caballos de cuatro meses de edad o más, seguidas de una tercera vacuna 6 meses después de la segunda dosis. Para un efecto continuado, el fabricante recomienda una dosis de refuerzo cada 12 meses.

3. Vacunas experimentales

Recientemente, la OMS ha incluido el virus Nipah como uno de los 11 agentes patógenos prioritarios con mayor 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, que establece una plataforma para la preparación de I+D que pretende acelerar la investigación y el desarrollo de productos antes y durante las epidemias (OMS, 2019). Se ha confirmado que al menos 13 candidatos a vacunas contra el virus Nipah están en desarrollo en etapas preclínicas (Gouglas *et al.*, 2019). Los candidatos se han centrado en el uso de la glicoproteína (G) y/o la proteína de fusión (F) del NiV como inmunógenos en varias plataformas, incluyendo vacunas de ADN, vacunas de subunidades, vectores no replicantes, así como vectores replicantes. Una vacuna basada en la proteína G del VNi-B en un vector de adenovirus de simios deficiente en replicación en hámsteres sirios (ChAdOx1 NiVB) ha mostrado resultados prometedores (Van Doremalen *et al.*, 2019). Una pauta de solo cebado, así como de cebado reforzado, protegió a los hámsteres sirios contra el desafío con una dosis letal de VNi-B y VNi-M.

BIBLIOGRAFÍA

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 Australia. *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 L.F. (2012). Cedar virus: a novel Henipavirus isolated from Australian bats. *PLoS Pathog*, **8**, e1002836.
- M 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.
- M 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/blueprint/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.onehit.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., SINNIAM 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 OIE para las enfermedades víricas de Nipah y Hendra
(puede consultarse en la página web de la OIE:

<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 OIE para cualquier otro dato sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para las enfermedades víricas de Nipah y Hendra

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2004. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2022.