

CAPÍTULO 3.6.5.

ENCEFALOMIELITIS EQUINA (DEL ESTE, DEL OESTE O VENEZOLANA)

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: Los virus de la encefalomiелitis equina del Este (EEE), del Oeste (EEO) y venezolana (EEV) pertenecen al género Alphavirus, en la familia Togaviridae. Los alfavirus de la EEE, la EEO y la EEV se encuentran en las Américas y pueden causar enfermedad tanto en el ser humano como en los équidos, originando encefalitis en la mayoría de los casos clínicos. Los virus de la EEE, la EEO y la EEV suelen mantenerse en la naturaleza alternando entre hospedadores vertebrados y mosquitos vectores. La encefalitis causada por estos virus de la encefalitis se produce de manera esporádica en caballos y humanos desde mediados de verano hasta finales de otoño en las regiones templadas, pero puede tener lugar durante todo el año en las zonas tropicales, en función de si las condiciones climáticas favorecen más o menos la presencia del mosquito vector. En los caballos, la enfermedad clínica se caracteriza por la presencia de fiebre, anorexia y depresión intensa. En los casos graves, puede evolucionar hacia la hiperexcitabilidad, ceguera, ataxia, depresión mental grave, postración, convulsiones y muerte.

La infección por el virus de la EEE en los caballos es a menudo fatal, mientras que el virus de la EEO puede provocar una enfermedad subclínica o moderada con menos de un 30% de mortalidad. Los principales hospedadores reservorio de la EEE y la EEO son aves paseriformes. La mayoría de infecciones aviarias son subclínicas, pero se ha descrito que tanto el virus de la EEE como el de la EEO provocan la enfermedad en las aves de corral, las aves de caza y las ratites. Algunos pequeños mamíferos, como los roedores, también pueden amplificar la EEE. Se ha informado de casos esporádicos de la EEE en vacas, ovejas, cerdos, ciervos y perros. Los caballos y los humanos son hospedadores terminales fortuitos de la EEE y la EEO. No obstante, algunos caballos pueden desarrollar una viremia transitoria que se ha sugerido que podría ser suficiente para transmitir el virus de la EEE a los mosquitos si se dan las condiciones adecuadas.

Los virus de la EEV se consideran unos de los agentes patógenos equinos más importantes de México, Centroamérica y Sudamérica. Por ejemplo, una epidemia de Colombia se relacionó con hasta 100 000 muertes de caballos y 150 000 casos humanos. Contrariamente a lo que ocurre con la EEE y la EEO, en el caso de la EEV, los caballos desempeñan un papel clave en la amplificación del virus, la propagación de la enfermedad y el mantenimiento de la epizootia. El complejo de virus de la encefalomiелitis equina (VEE) está formado por seis subtipos antigénicos (I–VI). Dentro del subtipo I, hay cinco variantes antigénicas (variantes AB–F). Inicialmente, los subtipos I-A y I-B se consideraban variantes claramente diferenciadas, mientras que actualmente se consideran idénticas (I-AB). Las variantes antigénicas I-AB y I-C se asocian a actividad epizootica en équidos y humanos. Históricamente, varios brotes han afectado a muchos miles de personas y de équidos. Las otras tres variantes del subtipo I (I-D, I-E, I-F) y los otros cinco subtipos del virus de la EEV (II–VI) circulan en ciclos enzoóticos naturales. Los équidos no son hospedadores terminales del virus de la EEV; sirven de hospedadores amplificadores a las cepas epizooticas de los virus de la EEV, mientras que los virus de la EEV enzoóticos circulan cíclicamente sobre todo en roedores salvajes y mosquitos. Las variantes y los subtipos enzoóticos se han considerado no patógenos para los équidos, pero pueden causar enfermedad clínica en el ser humano. Durante 1993 y 1996, se comprobó que algunos brotes de encefalitis equina de México estuvieron causados por virus enzoóticos del subtipo I-E de la EEV. Más recientemente, en México, Centroamérica y las partes norte y oeste de Sudamérica se han producido brotes esporádicos. Los subtipos enzoóticos humanos se extienden hasta zonas más amplias del interior de Centroamérica y Sudamérica (Weaver et al., 2012).

Detección del agente: Se puede realizar un diagnóstico presuntivo de la EEE, la EEO o la EEV cuando los caballos susceptibles presentan la somnolencia característica y otros signos de la enfermedad neurológica en las áreas en las que son activos los insectos hematófagos. No se presentan lesiones macroscópicas características. Las lesiones histopatológicas pueden proporcionar un diagnóstico presuntivo. Normalmente, el virus de la EEE puede aislarse a partir del encéfalo y, a veces, a partir de otros tejidos de los caballos muertos; sin embargo, los virus de la EEO y de la EEV raramente pueden aislarse. Los virus pueden aislarse a partir de muestras de campo mediante inoculación en huevos de gallina embrionados o en cultivos celulares. El virus se puede identificar mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), pruebas de fijación del complemento (FC), inmunofluorescencia o neutralización por reducción de placas (PRN). Se puede llevar a cabo una identificación específica de variantes epizooticas del virus de la EEV mediante la prueba de la inmunofluorescencia indirecta, con una PRN diferencial empleando anticuerpos monoclonales específicos de subtipo o de variante, o mediante la secuenciación del ácido nucleico.

Pruebas serológicas: Los anticuerpos pueden identificarse mediante la PRN, la inhibición de la hemoaglutinación (IH), la FC o el enzoinmunoanálisis de captura de IgM.

Requisitos para las vacunas: Las vacunas frente a la EEE o la EEO son seguras e inmunogénicas. Las únicas vacunas recomendadas frente a la EEV son vacunas de virus atenuados, creadas con la cepa TC-83, o bien preparaciones víricas inactivadas preparadas también a partir de dicha cepa. El virus atenuado es inmunógeno cuando se administra por vía intramuscular, y puede causar reacciones adversas en el receptor.

Las preparaciones víricas de virus de la EEV virulento inactivadas con formalina no deben utilizarse en équidos, puesto que puede quedar virus virulento residual tras el tratamiento con formalina, causando enfermedad grave tanto en animales como en personas. Ha habido epizootias de EEV debidas al uso de dichos virus tratados con formalina.

A. INTRODUCCIÓN

Los virus de la encefalomiелitis equina del Este (EEE), la del Oeste (EEO) y la venezolana (EEV) son miembros del género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*. Aunque están estrechamente relacionados, los virus de la EEE, EEO y EEV son genética y antigénicamente distintos (Arechiga-Ceballos & Aguilar-Setien, 2015, Kumar et al., 2018). La ecología natural para el mantenimiento del virus normalmente tiene lugar mediante la infección alterna de aves y mosquitos (EEE y EEO), y mosquitos y roedores (ciclo enzoótico del virus de la EEV) o mosquitos y caballos (ciclo enzoótico del virus de la EEV) (Arechiga-Ceballos & Aguilar-Setien, 2015; Go et al., 2014; Salimi et al., 2016). El virus de la EEE se ha aislado de serpientes, y estas podrían intervenir como hospedadores reservorio (Bingham et al., 2012; White et al., 2011). Puede presentarse la enfermedad clínica en los humanos y en los caballos, los cuales son hospedadores fortuitos definitivos tanto del virus de la EEE como del de la EEO (Kumar et al., 2018; Zacks & Paessler, 2010). No obstante, algunos caballos pueden desarrollar una viremia transitoria que se ha sugerido como posiblemente suficiente para transmitir el virus de la EEE a mosquitos si se dan las condiciones adecuadas (Franklin, 2002).

Los tres virus se clasifican como alfavirus presentes en las Américas y están presentes en las Américas (Arechiga-Ceballos y Aguilar-Setien, 2015). El virus de la EEE tiene linajes asociados tanto con América del Norte (predominantemente el centro y este de EE.UU., Canadá y América Central) como con América del Sur. La EEE se ha diagnosticado en Quebec y Ontario en Canadá, en las regiones central y oriental de los Estados Unidos de América (EE.UU.), las Islas del Caribe, México, y América Central y del Sur. Las cepas de América del Sur del virus de la EEE, anteriormente denominadas linajes II, III y IV, actualmente se conocen como virus Madariaga (Arrigo, 2010); el cambio se produjo después de que las cepas que causaron los brotes de Darien, Panamá, en 2010 (Carrera, 2013), condujeran a la re-evaluación de la secuenciación vírica y a la reclasificación de las cepas del virus de la EEE de América del Sur (virus Madariaga) como cepa divergente independiente. Históricamente, la EEO se ha detectado sobre todo en la parte oeste de EE.UU. y en Canadá, México y América Central y del Sur (Arechiga-Ceballos & Aguilar-Setien, 2015; Kumar, 2018; Morris, 1989; Reisen & Monath, 1989; Walton, 1981). El virus J de las tierras altas, relacionado antigénicamente con el virus de la EEO, se ha aislado en el este de EE.UU. Aunque generalmente se cree que el virus J de las tierras altas no provoca la enfermedad en los mamíferos, ha sido aislado a partir del encéfalo de un caballo que murió de encefalitis en Florida (Karabatsos et al., 1988). Se han

aislado virus de la EEV en América Central y del Sur, siendo la propagación más reciente la producida al sur de EE.UU. desde México en 1971 (Kumar, 2018; Oberste *et al.*, 1999; Salimi *et al.*, 2016; Sneider *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1999; Weaver *et al.*, 1999; Zehmer *et al.*, 1974).

Los signos clínicos de la EEE, la EEO y la EEV pueden ser idénticos. La enfermedad causada por cualquiera de los tres virus también se denomina enfermedad del sueño. Después de un periodo de incubación de entre 1 y 14 días, en función del virus y de la cepa, los signos clínicos son fiebre, anorexia y depresión. Puede realizarse un diagnóstico preliminar de la encefalomiелitis vírica equina en los caballos no vacunados si se observa la somnolencia típica cuando el vector (mosquito) es abundante durante el verano en los climas templados, o durante la estación húmeda en los climas tropicales o subtropicales. Sin embargo, varias enfermedades, como la causada por el virus del Nilo occidental (Capítulo 3.1.24), la rabia (Capítulo 3.1.17) y otras enfermedades infecciosas, parasitarias o no infecciosas, pueden ocasionar signos clínicos parecidos, y el diagnóstico debe confirmarse mediante las pruebas que se describen.

El virus de la EEE causa una enfermedad grave en los seres humanos con una tasa de mortalidad del 30–70% y una elevada frecuencia de aparición de secuelas permanentes en los supervivientes. La variante de América del Norte se considera más patógeno que las cepas de América del Sur (virus Madariaga) (Kumar *et al.*, 2018). Se ha observado que el virus de la EEE causa enfermedad en mamíferos distintos de los équidos y los humanos, incluidas las vacas (McGee *et al.*, 1992; Pursell *et al.*, 1976), las ovejas (Bauer *et al.*, 2005), los cerdos (Elvinger *et al.*, 1996), los ciervos de cola blanca (Tate *et al.*, 2005), y los perros (Farrar *et al.*, 2005). Las infecciones por el virus de la EEE suelen observarse en muy pocas zonas geográficas. La EEO suele ser leve en humanos adultos, pero puede ocasionar enfermedad grave en los niños. La tasa de mortalidad es de un 3-14%. En los caballos, la infección por el virus de la EEO se ha observado históricamente en una zona geográfica amplia, como por ejemplo, casos esporádicos en un área de más de 2590 km²; sin embargo, ningún brote de la enfermedad se ha atribuido al virus de la EEO desde 1999.

La mayoría de las infecciones por encefalomiелitis en aves domésticas están causadas por el virus de la EEE y ocurren en estados de la costa este de EE.UU. Los eventos aislados de alta mortalidad en aves de caza criadas en cautividad, principalmente faisanes, chukars, pingüinos de acuario y codornices, se han rastreado hasta la infección por el virus de la EEE, la EEO o el virus J de los Highlands (Morris, 1989; Reisen y Monath, 1989; Tuttle *et al.*, 2005). Aunque los mosquitos introducen el virus, la transmisión dentro de las bandadas se produce principalmente por picaje de plumas y canibalismo (Kumar *et al.*, 2018). Tanto los virus de la EEE como el de la EEO han causado enfermedad mortal en las ratites. Se ha observado enteritis hemorrágica en emús infectados por virus de la EEE y de la EEO, y las tasas de morbilidad y mortalidad pueden ser superiores al 85%; se ha observado que los virus J de los Highlands producen depresión, somnolencia, disminución de la producción de huevos y aumento de la mortalidad en pavos (Guy, 1997).

El complejo del virus de la EEV se compone de seis subtipos (I-VI). El subtipo I incluye cinco variantes antigénicas (AB-F), de las cuales I-AB e IC están asociadas a EEV epizootica en équidos y epidemias concurrentes en humanos (Calisher *et al.*, 1980; Monath y Trent, 1981; Pan-American Health Organización, 1972; Walton, 1981; Walton *et al.*, 1973; Walton y Grayson, 1989). Originalmente, los subtipos I-A e I-B se consideraban variantes distintas, pero ahora se consideran idénticos (I-AB). Se cree que las variantes epizooticas I-AB e I-C se originan a partir de mutaciones del serotipo enzoótico 1-D (Weaver *et al.*, 2004); solo se han obtenido cepas de I-AB e I-C durante las epizootias equinas. Las cepas enzoóticas incluyen variantes I-D, I-E e I-F del subtipo I, subtipo II, cuatro variantes antigénicas (A-D) del subtipo III y subtipos IV-VI. Normalmente, los virus de la EEV enzoóticos no producen encefalomiелitis clínica en la especie equina (Walton *et al.*, 1973), pero en 1993 y 1996, en México, el subtipo enzoótico 1-E causó epizootias limitadas en caballos (Estrada-Franco *et al.*, 2004). Las variantes y subtipos enzoóticos pueden producir enfermedad clínica en humanos (Monath y Trent, 1981; Organización Panamericana de la Salud, 1972; Powers *et al.*, 1997; Walton, 1981; Walton y Grayson, 1989).

Históricamente, la EEV epizootica se limitaba al norte y oeste de Sudamérica (Organización Panamericana de la Salud, 1972). Sin embargo, de 1969 a 1972, se produjo actividad epizootica (variante 1-AB) en ciertas partes de América del Norte y Central. En América del Norte, no se han producido epizootias de EEV causadas por el virus I-AB o IC desde 1972. Las cepas equinos y humanos del virus epizootico de la EEV fueron cepas del subtipo IC de Venezuela en 1993, 1995, 1996, 1999, 2000, 2003 (Navarro *et al.*, 2005), y de Colombia en 1995. Además, la

variante I-AB ha sido aislada de hámsteres centinela en Venezuela (Medina *et al.*, 2015). Para obtener información actualizada, consúltese la interfaz WAHIS de la OIE¹.

Los focos de variantes y subtipos enzoóticos se encuentran en áreas clasificadas como bosque húmedo tropical, es decir, aquellas áreas con un nivel freático alto o áreas pantanosas abiertas con arroyos serpenteantes iluminados por el sol. Estas son las áreas de las Américas donde las lluvias se distribuyen a lo largo del año o áreas con suministro permanente de agua. Los virus enzoóticos circulan entre roedores, y quizás aves, mediante la alimentación de mosquitos (Monath y Trent, 1981; Organización Panamericana de la Salud, 1972; Walton, 1981; Walton y Grayson, 1989). Se han identificado cepas enzoóticas del virus de la EEV en los Everglades de Florida (subtipo II), México (variante IE), países de América Central (variante IE), Panamá (variantes ID e IE), Venezuela (variante ID), Colombia (variante ID), Perú (variantes I-D, III-C y III-D), Guayana Francesa (variante III-B y subtipo V), Ecuador (ID de variante), Bolivia (ID de variante), Surinam (variante III-A), Trinidad (variante III-A), Brasil (variantes IF, III-A y subtipo IV) y Argentina (subtipo VI). En un nicho ecológico atípico, la variante III-B se ha aislado en EE. UU. (Colorado y Dakota del Sur) en una asociación inusual con las aves (Aguilar *et al.*, 2009; Monath y Trent, 1981; Organización Panamericana de la Salud, 1972; Walton, 1981; Walton & Grayson, 1989), mientras que el virus Everglades es un virus de la EEV subtipo II que infecta a roedores y perros en Florida.

1. Bioseguridad

Se han notificado casos de enfermedad clínica grave y muerte causada por virus de la EEE y de la EEO en trabajadores de laboratorio. Las manipulaciones de laboratorio deben llevarse a cabo a un nivel apropiado de bioseguridad y bioprotección, que vendrá determinado por un análisis del riesgo (ver Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioseguridad: Norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y las instalaciones para animales*). Se recomienda que el personal esté inmunizado contra el virus de la EEE (*United States Department of Health and Human Services*, 2009). También se deben tomar precauciones para prevenir la infección humana al realizar exámenes post mortem en caballos sospechosos de estar infectados por virus de la encefalomiелitis equina.

Las infecciones por el virus de la EEV humana se han originado por transmisión de aerosoles de los restos de las jaulas de roedores de laboratorio infectados y de accidentes de laboratorio (Quiroz *et al.*, 2009). Ha habido trabajadores de laboratorio que han contraído infecciones por variantes y subtipos epizoóticos y enzoóticos (*American Committee on Arthropod-Borne Viruses [ACAV]*, 1980). En los seres humanos puede producirse una enfermedad clínica grave o la muerte. Aquellos que manejan virus de la EEV infecciosos o sus antígenos preparados a partir de tejidos o cultivos celulares infectados deben vacunarse y demostrar que tienen anticuerpos neutralizantes específicos contra el virus de la EEV (Berge *et al.*, 1961; Organización Panamericana de la Salud, 1972). Si la vacunación no es una opción viable, se recomienda equipo de protección personal adicional que incluya protección respiratoria para todos los procedimientos. Las manipulaciones de laboratorio deben llevarse a cabo a un nivel apropiado de bioseguridad y bioprotección, que vendrá determinado por un análisis del riesgo (véase el Capítulo 1.1.4).

1 <https://www.woah.org/es/que-hacemos/sanidad-y-bienestar-animal/recopilacion-de-datos-sobre-enfermedades/>

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la EEE, la EEO y la EEV, y su propósito²

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección del agente^(a)						
RT-PCR	–	++	–	+++	–	–
Aislamiento en cultivo celular	–	++	–	+++	–	–
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA de captura de IGM	–	+	–	++	–	–
Neutralización por reducción de placas	+++	+	–	++	+++	+++
Inhibición de la hemaglutinación (muestras pareadas)	+	++	–	++	++	++
Fijación del complemento (muestras pareadas)	–	+	–	++	–	–

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;

IgM ELISA = enzimoimmunoanálisis de inmunoglobulina M.

(a) Se recomienda aplicar varios métodos de identificación del agente a una misma muestra clínica.

1. Detección del agente

1.1. Cultivo *in-vitro* e *in-vivo*

El método definitivo para el diagnóstico de la EEE o la EEO consiste en el aislamiento seguido de la tipificación. Normalmente el virus EEE puede aislarse a partir de los encéfalos de los caballos, a menos que hayan pasado más de 5 días entre la aparición de los signos clínicos y la muerte del animal. Frecuentemente el virus de la EEE puede aislarse a partir de tejido encefálico, incluso en presencia de un título de anticuerpo sérico elevado. El virus de la EEO raramente se aísla a partir de los tejidos de los caballos infectados. El encéfalo es el tejido preferido para el aislamiento del virus, aunque este ha sido aislado a partir de otros tejidos, como el hígado o el bazo.

2 En el caso de la EEO y la EEV, no todas las pruebas se han evaluado exhaustivamente en caballos infectados de forma natural.

Durante la infección por el virus de la EEO, la viremia coincide con el inicio de la pirexia en un plazo máximo de 12–24 horas tras la infección. La viremia suele terminar 5–6 días después del inicio de la infección, y coincide con la producción de anticuerpos neutralizantes y la aparición de signos clínicos neurológicos. A menudo, los virus de la EEO no puede aislarse a partir del encéfalo de los équidos infectados. De los animales febriles que se hallen en estrecho contacto con los casos de encefalitis clínica, deben extraerse muestras de sangre para el aislamiento del virus. Se recomienda recoger un conjunto completo de estos tejidos por duplicado, uno para el aislamiento del virus y el otro en presencia de formalina para su examen histopatológico. Los especímenes destinados al aislamiento del virus deberían enviarse refrigerados, si se pueden recibir en el laboratorio en un plazo máximo de 48 horas tras la extracción; en otro caso, deben congelarse y enviarse con hielo seco. La recogida de un conjunto completo de tejidos permitirá utilizar técnicas diagnósticas de otras enfermedades. Para llevar a cabo el aislamiento del virus, se prepara una suspensión del tejido al 10% en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,8, que contenga seroalbúmina bovina (BSA) (fracción V; 0,75%), penicilina (100 unidades/ml), y estreptomina (100 µg/ml). La suspensión se clarifica mediante centrifugación a 1.500 *g* durante 30 minutos.

Los virus de la EEE, la EEO y la EEV pueden aislarse en varios tipos de cultivos celulares. Los que más se utilizan son los fibroblastos de embrión de pollo o pato, las líneas celulares continuas de riñón de mono verde africano (Vero), el riñón de conejo (RK-13), o el riñón de hámster recién nacido (BHK-21). El aislamiento se hace normalmente en frascos de cultivo celular de 25 cm². Se inoculan las células confluentes con 1,0 ml de suspensión de tejido. Tras un período de absorción de entre 1 y 2 horas, la monocapa celular se lava dos veces con medio de cultivo o PBS, y se añade medio de mantenimiento. Se incuban los cultivos durante 6–8 días, y se realiza un pase ciego. Los virus de la EEE, la EEO y la EEV producirán una alteración citopática en el cultivo celular. Se congelan los cultivos que estén infectados. El líquido de los cultivos descongelados se utiliza para la identificación del virus.

Pueden inocularse suspensiones de tejido en la yema de huevos de pollo embrionados de 6–8 días. En los embriones infectados con estos virus no existen signos diagnósticos o lesiones. Los embriones inoculados deben incubarse durante 7 días, aunque normalmente las muertes tienen lugar entre 2 y 4 días después de la inoculación. Generalmente sólo se realiza un pase, a menos que se observen embriones muertos, a partir de los cuales no se puede aislar el virus.

Las cepas víricas aisladas se pueden identificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), mediante la prueba de la inmunofluorescencia indirecta o directa o mediante la prueba de la neutralización por reducción de placas (PRN) empleando anticuerpos policlonales o monoclonales contra virus específicos, los cuales pueden obtenerse por adquisición comercial o bien preparándolos a partir de una hiperinmunización de animales, la posterior extracción del respectivo suero (o líquido ascítico en el caso de los ratones) y la purificación de las globulinas.

1.2. Métodos moleculares – detección de ácido nucleico

1.2.1. PCR convencional con transcripción inversa

Se han descrito varios métodos RT-PCR para detectar ARN del virus de la EEE, la EEO y la EEV en mosquitos y tejidos de vertebrados, aunque solo unos pocos han sido ampliamente validados para muestras de mamíferos (Linssen *et al.*, 2000; Monroy *et al.*, 1996; Vodkin *et al.*, 1993). Se desarrolló un método de RT-PCR múltiple anidada para realizar un diagnóstico diferenciado en casos sospechosos de EEE o encefalomiелitis arboviral del Nilo occidental en caballos (Johnson *et al.*, 2003). Ha mejorado la rapidez y la sensibilidad de la prueba en comparación con el aislamiento mediante cultivo celular y se ha utilizado mucho en los laboratorios del servicio nacional veterinario de EE.UU. (NVSL³) durante varias estaciones consecutivas de arbovirus. En la Tabla 2 se muestran las secuencias de los cebadores empleados en NVSL para la detección de ARN vírico de los virus de la EEE, EEO y EEV. La primera reacción se lleva a cabo en un tubo y empieza con transcripción inversa a 46–50°C (dependiendo del intervalo de temperatura óptima de la enzima que se utilice) durante 30 minutos seguida de activación de la polimerasa a 95°C durante 15 minutos. A continuación, se llevan a cabo 35 ciclos que consisten en desnaturalización a 94°C durante 45 segundos;

3 NVSL: National Veterinary Service Laboratories (de EE.UU.).

hibridación a 58°C durante 45 segundos y prolongación a 72°C durante 1 minuto. Al final de la reacción, se aplica un paso más de prolongación a 72 durante 9 minutos. La PCR anidada emplea 1 µl del primer producto de la PCR en 50 µl de mezcla de reacción, y se ejecuta en las siguientes condiciones de ciclado: activación de la polimerasa a 95°C durante 15 minutos, 35 ciclos de los pasos descritos arriba con una temperatura de hibridación de 46°C, seguidos de la prolongación final a 72°C durante 9 minutos.

También se desarrolló un método destinado a detectar variantes de virus VEE empleando un par de cebadores degenerados (Tabla 2) (Pisano et al., 2012). Después de la transcripción inversa a 46-50°C (dependiendo de la enzima que se utilice) durante 30 minutos y la desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, los autores recomiendan una primera PCR (40 ciclos) que consiste en la desnaturalización a 94°C durante 30 segundos; hibridación a 64°C durante 60 segundos; y prolongación a 72°C durante 30 segundos, complementada con una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Para la reacción anidada, se mezclan 2 µl del producto de la primera PCR con 50 µl de mezcla de reacción y se someten a una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificación que consisten en la desnaturalización a 94°C durante 30 segundos; hibridación a 61°C durante 40 segundos; y prolongación a 72°C durante 30 segundos. A continuación, se aplica una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Tabla 2. Cebadores utilizados para la detección de ARN de los virus de la EEE, la EEO y la EEV mediante RT-PCR anidada

Virus	Posición en el genoma	Longitud del amplicón	Secuencia del cebador (5' → 3')	Fuente
EEE (1ª fase)	9233–9797	565	F: AGG-GCT-TAC-CTG-ATT-GAC R: GTA-ACG-CCA-GGA-GTA-TTG	NVSL
EEE (anidada)	9571–9710	140	F: GGC-TCA-AGA-GTC-AGG-AGA R: CGG-ATG-TGA-CAC-AAG-AGA	NVSL
EEO (1ª fase)	9032–9621	590	F: TAA-GTG-TGG-CGA-CTA-CAG R: TCA-GGC-AGT-CTC-TTC-TTG	NVSL
EEO (anidada)	9241–9575	335	F: CTC-ACA-CGC-CTA-CAG-TCA R: AGT-GCC-TAC-CAG-GAT-AGC	NVSL
EEV I-AB/C/D (1ª fase)	9215–9776	562	F: AGC-CAG-TGC-ACA-AAG-AAG R: TAG-GTG-TTA-GCC-GGT-AAG	NVSL
EEV I-AB/C/D (anidada)	9536–9671	136	F: GGG-TGG-GAG-TTT-GTA-TGG R: CCA-GGA-TGG-TGG-ACA-TAG	NVSL
EEV I-E (1ª fase)	9611–10085	475	F: GTA-ATC-CAC-ACG-GAC-TAC R: GCA-TAA-CCC-GCT-CTG-TTG	NVSL
EEV I-E (anidada)	9794–9955	162	F: GCA-TGC-CTC-TGT-GCT-TAG R: ATT-TCA-GCA-AGC-GGG-TAG	NVSL
EEV todos (1ª fase)	45–176	156	F: ATG-GAG-AAR-GTT-CAC-GTT-GAY-ATC-G R: YTC-GAT-YAR-YTT-NGA-NGC-YAR-ATG-C	Pisano et al., 2012
EEV todos (anidada)	83–163	80	F: ARG-AYA-GYC-CNT-TCC-TYM-GAG-C R: CRT-TAG-CAT-GGT-CRT-TRT-CNG-TNA-C	Pisano et al., 2012

F: directo; R: inverso.

También se ha descrito una combinación de RT-PCR con enzimoimmunoanálisis (ELISA: RT-PCR-ELISA) como método para identificar alfavirus que son patógenos para el ser humano (Wang et al., 2006).

1.2.2. PCR en tiempo real con transcripción inversa

Se ha descrito una detección multiplexada del ARN de los virus de la EEE y la EEO mediante RT-PCR en tiempo real (Kang et al., 2010), pero este método no se ha evaluado de forma extensiva en muestras de campo. Se ha desarrollado y validado con un conjunto pequeño de muestras de campo una RT-PCR en tiempo real sensible para la detección de variantes de Norteamérica de ARN de virus de la EEE y la EEO, y ha mostrado una sensibilidad superior a la del aislamiento del virus en cultivo de células Vero (Lambert et al., 2003). Los cebadores y las sondas (Tabla 3) se evaluaron con un conjunto de estructuras de ARN sintético que incorporaban distintas sustituciones presentes en variantes de virus de la EEE y la EEO de Norteamérica (Vina-Rodriguez et al., 2016). Ello confirmó la alta sensibilidad y especificidad de los reactivos desarrollados por Lambert et al. (2003). La RT-PCR en tiempo real empieza con una transcripción inversa a 46–50°C (dependiendo de la enzima que se utilice) durante 30 minutos seguida de una activación de la polimerasa *Taq* a 95°C durante 15 minutos. A continuación, se ejecutan 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos y prolongación a 72°C durante 30 segundos.

Se ha evaluado una RT-PCR en tiempo real para la detección de VEE (Vina-Rodriguez et al., 2016) con un conjunto de oligonucleótidos de ARN sintético, y precisa una posterior validación con muestras de campo de VEE. Esto es especialmente importante porque la zona del genoma nsP1 donde se han seleccionado los cebadores y las sondas está muy conservada en los alfavirus (Eshoo et al., 2007) y debe descartarse la posibilidad de una reacción cruzada no deseada.

Tabla 3. Cebadores y sondas de la RT-PCR en tiempo real para virus de la EEE, la EEO y la EEV. Ambas sondas están marcadas con FAM y silenciadas con BHQ1 (Lambert et al., 2003)

Virus	Nombre del reactivo	Posición en el genoma	Secuencia (5'-3')	Longitud del amplicón
EEE	EEE 9391, cebador F	9391–9411	ACA-CCG-CAC-CCT-GAT-TTT-ACA	69
	EEE 9459c, cebador R	9459–9439	CTT-CCA-AGT-GAC-CTG-GTC-GTC	
	EEE 9414 Sonda	9414–9434	TGC-ACC-CGG-ACC-ATC-CGA-CCT	
EEO	EEO 10,248 cebador F	10,248–10,267	CTG-AAA-GTC-GGC-CTG-CGT-AT	67
	EEO 10,314c cebador R	10,314–10,295	CGC-CAT-TGA-CGA-ACG-TAT-CC	
	EEO 10,271	10,271–10,293	ATA-CGG-CAA-TAC-CAC-CGC-GCA-CC	
EEV	AlphaVIR966 cebador F	151-178	TCC-ATG-CTA-ATG-CYA-GAG-CGT-TTT-CGC-A	98
	AlphaVIR966 cebador R	248-225	TGG-CGC-ACT-TCC-AAT-GTC-HAG-GAT	
	INEID-VEEV Sonda	193-218	TGA-TCG-ARA-CGG-AGG-TRG-AMC-CAT-CC	

F: directo; R: inverso.

1.3. Detección de antígeno

Se ha desarrollado un ELISA de captura de antígeno para la vigilancia de la EEE en mosquitos. Se puede utilizar en países que no disponen de instalaciones para el aislamiento de virus o de RT-PCR (Brown et al., 2001). Los procedimientos de inmunohistoquímica (IHC) son muy útiles para el

diagnóstico de la EEE porque se llevan a cabo en tejidos fijados (Pennick *et al.*, 2012). En la IHC, la diana es una proteína de envoltura del virus de la EEE. Se examinan zonas necróticas e inflamadas del encéfalo. En caballos infectados por el virus de la EEE, se observa una tinción positiva sobre todo en las neuronas y en dendritas relacionadas. No obstante, el no identificar el antígeno vírico en el sistema nervioso central equino no descarta la infección.

2. Pruebas serológicas

La confirmación serológica de la infección por el virus de la EEE o la EEO implica un aumento o descenso de 4 o más veces en el título de anticuerpos de las muestras de pares de sueros recogidos con 10–14 días de diferencia. Cuando se manifiesta la enfermedad clínica, la mayoría de los caballos infectados por los virus de la EEE o la EEO presentan un título elevado de anticuerpos. En consecuencia, puede realizarse un diagnóstico presuntivo si un caballo no vacunado y con los signos clínicos adecuados presenta anticuerpos frente a los virus de la EEE y la EEO. Contrariamente a lo que ocurre con los virus de la EEE y la EEO, el inicio de los signos clínicos y posterior producción de anticuerpos IgG contra el virus de la EEV tiene lugar poco después de la infección. La aparición de encefalitis es variable, y por lo tanto, algunos caballos con signos neurológicos podrían no presentar un incremento de cuatro veces o más en los títulos de anticuerpos analizados en sueros apareados. Debe obtenerse suero cuando empiezan los signos clínicos y repetirse la extracción de sangre en cinco a nueve días para comparar los títulos. La detección de IgM mediante un ELISA puede indicar una infección aguda o una exposición reciente al virus, incluida una vacunación reciente y, por lo tanto, los resultados de la serología deben interpretarse en función de los signos clínicos y de la situación epizootica (Sahu *et al.*, 1994). Para interpretar los resultados de cualquier prueba serológica también debe tenerse en cuenta el historial de vacunación, sobre todo en el caso de la PRN y de la neutralización del virus (VN). Aunque los subtipos y variantes enzoóticas del virus de la EEV no son patógenos en los équidos, la infección estimulará la producción de anticuerpos que pueden reaccionar de forma cruzada en las pruebas de diagnóstico con variantes epizooticas del virus de la EEV. Además, puede haber reacciones cruzadas entre los anticuerpos contra los virus de la EEE y de la EEO en pruebas como la fijación del complemento (FC) y la inhibición de la hemaglutinación (HI). Los anticuerpos contra los virus de la EEE y la EEO que detecta la FC aparecen más tarde y no persisten, motivo por el cual esta prueba es menos útil para el diagnóstico serológico de la enfermedad.

2.1. Prueba de fijación del complemento

La prueba de la FC se utiliza frecuentemente para demostrar la presencia de anticuerpos, aunque los anticuerpos que se detectan mediante esta prueba pueden no persistir durante tanto tiempo como los que se detectan con las pruebas IH o PRN. Como antígeno se utiliza habitualmente un extracto de encéfalo de ratón obtenido en presencia de sacarosa/acetona. El antígeno positivo se inactiva mediante tratamiento con beta-propiolactona al 0,1%. La efectividad de este tratamiento debe confirmarse con pruebas de viabilidad empelando cultivo *in vivo* o *in vitro* (véase el apartado B.1.1) antes de trabajar con el antígeno en la mesa del laboratorio.

En ausencia de un suero internacional normalizado, el antígeno debe titularse frente a un suero positivo control preparado en la región. El antígeno normal, o antígeno control, consiste en encéfalo de ratón obtenido a partir de ratones no inoculados, y extraído y diluido de manera similar.

Los sueros se diluyen a 1/4 en solución salina tamponada con veronal que contenga gelatina (VBSG) al 1% y se inactivan sometiéndolos a 56°C durante 30 minutos. Las titulaciones de los sueros positivos pueden llevarse a cabo empleando diluciones medias adicionales. Los antígenos para la FC y el antígeno control (encéfalo de ratón sano) se diluyen en VBSG hasta conseguir la cantidad óptima para su fijación, la cual se determina mediante titulación frente a los sueros positivos; el complemento de cobaya se diluye en VBSG hasta contener 5 unidades hemolíticas de complemento 50% (CH₅₀). Los sueros, el antígeno y el complemento se mezclan durante 18 horas a 4°C en placas de microtitulación con fondo redondo. Los eritrocitos de oveja (SRBC) se estandarizan hasta obtener una concentración del 2,8%. La hemolisina se titula para determinar la dilución óptima frente al lote de complemento utilizado. La hemolisina se emplea para sensibilizar los SRBC al 2,8%, y estos se añaden a todos los pocillos de la placa de microtitulación. La prueba se incuba durante 30 minutos a 37°C. Las placas se centrifugan (a 200 *g*), y los pocillos se puntúan en cuanto a la presencia de hemólisis. Se utilizan los siguientes controles: (a) suero y suero control con 5 CH₅₀ y 2,5 CH₅₀, respectivamente; (b) antígeno para la FC y antígeno control, cada uno con 5 CH₅₀ y 2,5 CH₅₀ de complemento, respectivamente; (c) diluciones de complemento de 5 CH₅₀, 2,5 CH₅₀, y 1,25 CH₅₀; y (d) pocillos con células control, con sólo SRBC, y VBGS como diluyente. Estos controles se ensayan para determinar la presencia de suero y

antígeno anticomplementarios, la actividad del complemento utilizado en la prueba, y la integridad del sistema indicador de SRBC en ausencia de complemento, respectivamente.

Para evitar los efectos anticomplementarios, los sueros deben separarse de la sangre lo antes posible tras la extracción y antes de que se haya producido coagulación. En la prueba deben utilizarse sueros control positivos y negativos.

2.2. Inhibición de la hemoaglutinación

El antígeno que se emplea para realizar la prueba de IH es el mismo que el descrito anteriormente para la prueba FC. El antígeno se diluye de manera que la cantidad empleada en cada unidad de hemoaglutinación (HAU) es de 4 a 8 veces la que aglutina el 50% de los RBC en el sistema de la prueba. El título de hemoaglutinación y el pH óptimo para cada antígeno se determinan con RBC de oca diluidos en soluciones tamponadas a un pH que varía entre 5,8 y 6,6, con incrementos de 0,2 unidades.

Los sueros se diluyen 1/10 en tampón salino borato, pH 9,0, y se inactivan a 56°C durante 30 minutos. El tratamiento con caolín se emplea para eliminar los inhibidores específicos del suero. Como alternativa, pueden separarse los inhibidores inespecíficos mediante el tratamiento del suero con acetona en dilución de 1/10 en PBS seguido de su reconstrucción en tampón borato salino. Los sueros deberían adsorberse antes de su uso mediante la incubación durante 20 minutos a 4°C con un volumen de 0,05 ml de RBC de oca lavados y concentrados.

Después de realizar la inactivación mediante calor, el tratamiento con caolín y la absorción, se preparan diluciones dobles del suero tratado en tampón borato, pH 9,0, con ovoalbúmina al 0,4%. Se preparan diluciones dobles del suero (0,025 ml/pocillo) con tampón borato, pH 9,0, con ovoalbúmina al 0,4% en una placa de microtitulación de fondo redondo con 96 pocillos. Se añade el antígeno (0,025 ml/pocillo) al suero. Las placas se incuban a 4°C durante la noche. Los RBC derivan de machos de ganso blanco⁴ y se lavan tres veces con dextrosa/gelatina/veronal (DGV), y se prepara una suspensión al 7% en DGV. La suspensión al 7% se diluye 1/24 en la solución de pH adecuada, y se añaden inmediatamente a las placas a razón de 0,05 ml por pocillo. Las placas se incuban durante 30 minutos a 37°C. En cada prueba se incorporan sueros control positivos y negativos. Una prueba sólo se considera válida si los sueros control dan los resultados esperados. Los títulos de 1/10 y 1/20 son sospechosos, y los títulos de 1/40 y superiores son positivos.

2.3. Enzimoimmunoanálisis

Existen a la venta varios kits para la detección de IgM en muestras equinas. La técnica ELISA se realiza recubriendo las placas de fondo plano con un anticuerpo anti IgM equina de captura (Sahu *et al.*, 1994). El ejemplo siguiente aporta una descripción general del procedimiento, que puede variar según las recomendaciones del fabricante, destinadas a lograr el equilibrio óptimo entre sensibilidad y especificidad de la prueba.

El anticuerpo anti IgM equina se diluye en tampón carbonato 0,5 M, pH 9,6, y se añaden 50–100 µl de esta solución a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Las placas se incuban a 37°C durante 1 hora y toda la noche a 4°C. Antes de su uso, las placas recubiertas se lavan tres veces con 200 µl/pocillo de PBS 0,01 M que contiene Tween 20 al 0,05%. Después del segundo lavado, se añaden 200 µl/pocillo de PBS/Tween/leche desnatada en polvo al 5% (u otro reactivo bloqueante), y las placas se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación, las placas se lavan de nuevo tres veces con PBS/Tween. Los sueros control y problema se diluyen a 1/400 con PBS 0,01 M, pH 7,2, que contiene Tween 20 al 0,05%, y se añaden 50 µl en cada pocillo. Las placas se incuban a 37°C durante 90 minutos y después se lavan tres veces. A continuación, se añaden 50 µl de antígeno vírico a todos los pocillos. Las placas se incuban durante la noche a 4°C y se lavan tres veces. Después se añaden 50 µl de anticuerpo monoclonal (MAb) específico frente al antígeno vírico utilizado conjugado con peroxidasa de rábano. Las placas se incuban durante 60–90 minutos a 37°C y después se lavan seis veces. Finalmente, se añaden 50 µl de substrato ABTS (2,2-Azino-bis-[3-etilbenzo-tiazolin-6-

4 Son preferibles los RBC de los gansos blancos adultos domésticos, aunque se pueden utilizar otros gansos machos. Si se utilizan células de hembras, pueden presentar mayor variabilidad en la prueba. Se ha descrito que los RBC de gallo provocan un descenso de la sensibilidad de la prueba.

sulfónico] recién preparado + peróxido de hidrógeno (0,1%), y se incuban las placas a temperatura ambiente durante 15–40 minutos. La absorbancia lumínica se mide a 405 nm. Una muestra problema se considera positiva si su absorbancia en los pocillos que contienen antígeno vírico es de al menos el doble de la absorbancia de la muestra analizada en paralelo en los pocillos que contienen el antígeno control negativo. Para asegurar la especificidad, cada muestra de suero se analiza para determinar la reactividad ante el antígeno vírico y ante el antígeno control.

2.4. Neutralización por reducción de placas

La prueba PRN es muy específica y puede utilizarse para distinguir entre las infecciones por los virus de la EEE, la EEO y la EEV. La PRN se realiza con fibroblastos de embrión de pato, o con cultivos celulares de células Vero o BHK-21 en frascos de 25 cm² o placas de seis pocillos. Los volúmenes listados a continuación corresponden a los frascos, y se deben reducir a la mitad si se van a utilizar placas con seis pocillos. Antes de proceder al análisis, el suero se inactiva por calor sometiéndolo a 56°C durante 30 minutos. Se pueden analizar a una dilución final de 1/10 y 1/100. Los puntos finales pueden establecerse empleando la PRN o la IH si se va a trabajar con diluciones séricas seriadas (por ejemplo, a la mitad, a una quinta parte, a una décima parte, etc). Esto es especialmente útil en el caso de las muestras pareadas extraídas de un animal con varios días o semanas de diferencia entre la primera y la segunda. El suero que se utiliza en la prueba PRN se prueba frente a 100 unidades formadoras de placa (UFP) víricas (50 UFP en el caso de las placas con seis pocillos). La mezcla virus/suero se incuba a 37°C durante 75 minutos antes de la inoculación sobre monocapas confluentes de cultivo celular en frascos de 25 cm². El inóculo se adsorbe durante 1 hora, seguido de la adición de 6 ml de medio de cobertura. El medio de cobertura consiste en dos soluciones que se preparan separadamente. La solución I contiene Solución Básica de Sales de Earle 2× sin rojo fenol, 4% de suero bovino fetal, 100 µg/ml de gentamicina, 200 µg/ml de nistatina, una solución al 0,45% de bicarbonato de sodio, y rojo neutro al 0,002%. Cuando se usan fibroblastos de embrión de pato, la solución I también contiene un 6,6% de hidrolizado de lactoalbúmina y extracto de levadura. La solución II contiene un 2% de agar noble esterilizado y mantenido a 47°C. Se mezclan volúmenes iguales de las soluciones I y II se ajustan a 47°C justo antes de usarse. La prueba se incuba durante 48–72 horas, y los puntos finales se basan en una reducción del 90% en el número de placas comparado con los frascos con el virus control, los cuales deben producir unas 100 placas.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

Existen a la venta vacunas inactivadas frente a los virus de la EEE y la EEO. Las vacunas con virus atenuados de la EEE y la EEO no han resultado satisfactorias. Las vacunas autorizadas para su comercialización en los EEUU se preparan empleando las siguientes combinaciones: EEE y EEO; EEE, EEO y encefalomiелitis equina de Venezuela (EEV); y EEE y EEV. Además, se han combinado toxoide del tétano, virus inactivado de la gripe, herpesvirus inactivados (VH-1 y VH-4) y virus inactivado del Nilo occidental con EEE y EEO, o EEE, EEO, y EEV. Las vacunas actuales se preparan a partir de virus propagados en cultivo celular, e inactivados con formalina (Maire et al., 1970).

Las vacunas recomendadas contra la infección por el virus de la EEV son una vacuna vírica atenuada, con la cepa TC-83, y una preparación vírica inactivada a partir de la misma cepa (Monath & Trent, 1981; Pan-American Health Organization, 1972; Walton, 1981; Walton & Grayson, 1989). Deben seguirse las instrucciones de uso del producto comercial.

La vacuna inactivada debe administrarse en dos dosis con un intervalo de 2-4 semanas entre ambas. Se recomienda una revacunación anual a no ser que el prospecto del fabricante indique lo contrario.

La vacuna atenuada debe reconstituirse con solución salina fisiológica y administrarse de inmediato. Mientras se esté utilizando la vacuna, los viales multidosis deben conservarse sobre hielo. Toda vacuna no utilizada en un plazo máximo de 4 horas tras la reconstitución, debe desecharse por medios adecuados. Los animales de más de 3 meses se vacunan por vía subcutánea en la región cervical y con una dosis única. Se recomienda una revacunación anual. Las recomendaciones específicas de cada ambiente local pueden variar en función del

riesgo. Puede resultar útil consultar con un veterinario especializado en caballos para determinar cuál es el programa más adecuado.

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se indican en el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices indicadas a continuación y en el capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden complementarse con requisitos nacionales o regionales.

2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas

2.1. Características del inóculo

Véase el Capítulo 1.1.8 para conocer los requisitos generales para los Inóculos Primarios y los pases permitidos para la producción de vacuna. Los lotes de inóculo adecuados deben mantenerse a -70°C en estado liofilizado.

2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

Las cepas normalizadas de los virus de la EEE y la EEO que fueron aisladas hace unos 20 años han sido utilizadas para la producción de la vacuna y han resultado ser capaces de inducir una inmunidad protectora. En diferentes regiones se han identificado cepas del virus de la EEE que son distintas antigénicamente y en cuanto a su estructura molecular. Sin embargo, las cepas de América del Norte y el Caribe parecen similares (Weaver *et al.*, 1994). Las cepas del virus de la EEO aisladas en diferentes países han resultado ser semejantes, en base a pruebas con MAb y a los análisis de huella genética de oligonucleótidos de ARN (Reisen & Monath, 1989). Sería ventajoso utilizar una cepa bien caracterizada del país donde se va a emplear la vacuna. Los virus seleccionados deben ser inmunogénicos y replicarse en cultivo celular con títulos elevados.

La cepa vacunal TC-83 de la vacuna contra el virus de la EEV se originó de la cepa de asno de Trinidad (una variante de I-AB) del virus de la EEV epizootica aislado en 1944. Esta cepa deriva de un pase seriado de la cepa de asno de Trinidad por células de corazón de feto de cobaya. Es segura e inmunógena al número de pases establecido, e induce inmunidad protectora en équidos vacunados, aunque a veces pueden producirse reacciones adversas. Esta vacuna se desarrolló inicialmente para su uso en personal relacionado con la investigación de alto riesgo del virus de la EEV.

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

En el MSV debe comprobarse la pureza, la identidad y la ausencia de agentes extraños en el momento previo a su uso para la fabricación de vacuna. El MSV debe estar libre de bacterias, hongos y micoplasmas. El MSV se cultiva en una línea celular Vero y en un tipo celular equino embrionario y se confirma mediante la técnica de la inmunofluorescencia para poner de manifiesto la ausencia de herpesvirus equino, adenovirus equino, virus de la arteritis equina, virus de la diarrea vírica bovina, reovirus y virus de la rabia como agentes extraños. El MSV también debe estar libre de virus extraños, lo cual deberá comprobarse por la ausencia de efecto citopático (ECP) y por la prueba de la hemadsorción en cultivo celular con la línea celular Vero y un tipo celular equino embrionario.

2.1.3. Validación como cepa vacunal

En una prueba de inmunogenicidad, el MSV al máximo nivel de pases destinado a la producción de vacuna debe demostrar su eficacia (protección) en una prueba de potencia realizada con vacunación/análisis serológicos en cobayas.

2.1.4. Procedimiento de emergencia para la aceptación provisional de nuevos virus a utilizar como inóculo primario (MSV) en el caso de una epizootia (con agentes patógenos con muchos serotipos)

En situaciones de emergencia debidas a epizootias, puede no haber tiempo suficiente para comprobar a fondo si nuevo MSV presenta agentes extraños; en estos casos, la aceptación provisional de una nueva cepa deberá basarse en un análisis del riesgo de la posibilidad de

contaminación por agentes extraños en el antígeno que se producirá a partir del nuevo MSV. Esta evaluación del riesgo deberá tener en cuenta las características del proceso, incluido el tipo y concentración de inactivante en el caso de las vacunas inactivadas, para permitir o no la liberación de cualquier nuevo producto.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

El MSV debe propagarse en líneas celulares que se sepa que permiten el crecimiento de los virus de la EEE, la EEO y la EEV. Véase el capítulo 1.1.8 para más información sobre la preparación y análisis de reservas celulares primarias. Las líneas celulares deben estar libres de virus extraños, bacterias, hongos y micoplasmas. La propagación del virus no debe superar los cinco pases desde el MSV, a no ser que pases posteriores demuestren aportar títulos serológicos suficientes en cobayas.

La línea celular susceptible se siembra en recipientes adecuados. Puede utilizarse medio mínimo esencial suplementado con suero fetal bovino (FBS) como medio para la producción. La incubación tiene lugar a 37°C.

Los cultivos celulares se inoculan directamente con reserva del virus de trabajo de la EEE, la EEO y la EEV, que en general se encuentra a 1 a 4 pases del MSV. Los cultivos inoculados se incuban durante 1–3 días antes de recolectar el medio de cultivo. Durante la incubación, los cultivos se observan a diario para comprobar si presentan ECP y contaminación bacteriana.

Las vacunas inactivadas pueden inactivarse químicamente con formalina y mezclarse con un adyuvante adecuado. La duración de la inactivación dependerá de la cinética de inactivación observada.

Los conservantes utilizados son timerosal a una dilución de 1/1.000 y antibióticos (neomicina, polimixina, anfotericina B, gentamicina y otros).

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

Todos los ingredientes utilizados en la fabricación de las vacunas contra la EEE, la EEO y la EEV deben estar definidos en protocolos aprobados de fabricación y coincidir entre lotes. Véase el capítulo 1.1.8 para conocer las directrices generales sobre los ingredientes de origen animal. Los ingredientes de origen animal deben proceder de un país con riesgo insignificante de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET).

2.2.3. Controles durante el proceso

En los lotes de producción debe comprobarse a diario si presentan alteraciones citopáticas. Tras la recolección, debe comprobarse si la suspensión de virus presenta contaminación microbiana. Los lotes de producción deben titularse en cultivo celular antes de la inactivación para estandarizar el producto. Los lotes de título bajo pueden concentrarse o mezclarse con lotes de título alto para lograr el título correcto.

Debe comprobarse si los lotes inactivados están totalmente inactivados, lo cual se realiza utilizando pollitos de entre 6 y 12 horas de vida.

2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad

Las muestras de vacuna inactivada y de vacuna viva se examinan para comprobar si presentan contaminación bacteriana o fúngica. El volumen de medio utilizado en estas pruebas deberá ser suficiente como para contrarrestar los posibles efectos bacteriostático o fungistático de los conservantes del producto. Para la prueba de presencia bacteriana, cada uno de diez recipientes, los cuales contendrán como mínimo 120 ml de medio de digesto caseína soja, se inocula con 0,2 ml extraídos de diez frascos de producto final. Los diez recipientes se incuban a 30–35°C durante 14 días y se observan para comprobar si

presentan crecimiento bacteriano. Para la prueba de presencia fúngica, cada uno de diez recipientes, los cuales contendrán como mínimo 40 ml de medio de digesto caseína soja, se inocula con 0,2 ml extraídos de diez frascos de producto final. Los diez recipientes se incuban a 20–25°C durante 14 días y se observan para comprobar si presentan crecimiento fúngico. Es posible que en determinados países existan requisitos propios.

ii) Identidad

Deben llevarse a cabo pruebas independientes para cada lote en el caso de que la prueba de potencia del lote, como las titulaciones en cultivo celular de vacunas de virus vivo no verifiquen suficientemente la identidad del agente patógeno presente en la vacuna. Las pruebas de identidad pueden incluir la inmunofluorescencia o pruebas de neutralización del suero.

iii) Inocuidad

Las pruebas de inocuidad del lote destinadas a comprobar la inactivación del virus se llevan a cabo en pollitos de entre 6 y 12 horas de vida. Se inoculan diez pollitos por vía subcutánea con 0,5 ml de producto y se observan a diario durante 10 días. Si aparecen reacciones desfavorables, el lote resulta inaceptable.

iv) Potencia del lote

Las pruebas de potencia se llevan a cabo inoculando diez cobayas con reserva de virus vacunal de la EEE, la EEO o la EEV, empleando media dosis de caballo en dos ocasiones, con 14-21 días de diferencia, por la vía recomendada para el caballo. Se analizan muestras de suero de cada animal vacunado y control 14-21 días después de la segunda dosis empleando la prueba de la PRN. Los títulos del virus de la EEE deben ser $\geq 1/40$, los títulos del virus de la EEO deben ser $\geq 1/40$, y los títulos del virus de la EEV deben ser de $\geq 1/4$ (US Code of Federal Regulations, 2000), empleando células Vero. Si se utilizan fibroblastos de embrión de pato en la prueba de la PRN, los títulos serán inferiores. Debe evitarse en la medida de lo posible el uso de animales en las pruebas de liberación de los lotes.

2.3. Requisitos para la aprobación del registro

2.3.1. Proceso de fabricación

Para aprobar el registro de las vacunas, deben enviarse a las autoridades todos los datos relativos a la fabricación de la misma y a las pruebas de control de calidad (véase el apartado C.2.1 y C.2.2). Esta información será la correspondiente a tres lotes de vacuna consecutivos, con un volumen no inferior a 1/3 del volumen del lote industrial habitual.

Los controles durante el proceso forman parte del proceso de fabricación.

2.3.2. Requisitos de inocuidad

La formulación final de la vacuna inactivada deberá comprobarse en un número reducido de animales de destino antes de llevar a cabo un estudio de campo a gran escala. La formulación final de la vacuna no debe causar reacciones adversas.

Deben llevarse a cabo estudios de campo de inocuidad para poder aprobar definitivamente una vacuna. En general, deben utilizarse dos series, en tres ubicaciones geográficas distintas y en las condiciones de cría animal habituales, y un mínimo de 600 animales. La vacuna debe administrarse según las recomendaciones de la ficha técnica (incluidas las dosis de refuerzo) y debe contener la cantidad máxima permitida de antígeno vírico. Si no se especifica el contenido máximo en antígeno, las series deberán ser de la potencia post-comercialización habitual prevista. Alrededor de un tercio de los animales deberá tener al menos la edad mínima recomendada para la vacunación.

i) Precauciones (peligros)

La vacuna deberá identificarse como inocua o patógena para el personal que la administre. Los fabricantes deberán advertir de forma suficiente que se precisa atención médica en

caso de auto-inyección (incluida la de adyuvantes, vacunas en emulsión oleosa, conservantes, etc.), incluyendo advertencias en la ficha técnica/prospecto del producto para que el personal que lo administre sea consciente de todos los peligros.

2.3.3. Requisitos de eficacia

Para registrar una vacuna comercial, debe ponerse de manifiesto la eficacia (la protección que confiere) de un lote o lotes producidos según el método estándar y que contengan la cantidad mínima de antígeno, o bien su valor de potencia, llevando a cabo pruebas de potencia que se realizarán vacunando/analizando mediante serología a cobayas; cada futuro lote comercial deberá analizarse antes de ser liberado, con el fin de garantizar que tiene el mismo valor de potencia que se ha observado en el/los lote/s utilizado/s para la/s prueba/s de eficacia.

2.3.4. Vacunas que permiten una estrategia DIVA (detección de infección en animales vacunados)

Ninguna conocida.

2.3.5. Duración de la inmunidad

Sobre la duración de la inmunidad no hay estudios exhaustivos disponibles. Se recomienda una revacunación anual en el caso de la vacuna inactivada. Los potros vacunados antes de un año de edad deben volver a ser vacunados de nuevo antes de la siguiente estación del vector.

2.3.6. Estabilidad

La vacuna liofilizada es estable e inmunogénica durante 2 años si se mantiene refrigerada a 2–7°C. La vacuna debe desecharse después de 2 años. Deben respetarse las fechas de caducidad recomendadas que constan en el envase.

BIBLIOGRAFÍA

AGUILAR P.V., ADAMS A.P., SUÁREZ V., BEINGOLEA L., VARGAS J., MANOCK S., FREIRE J., ESPINOZA W.R., FELICES V., DIAZ A., LIANG X., ROCA Y., WEAVER S.C. & KOCHER T.J. (2009). Genetic characterization of Venezuelan equine encephalitis virus from Bolivia, Ecuador and Peru: identification of a new subtype ID lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **3**, e514.

AMERICAN COMMITTEE ON ARTHROPOD-BORNE VIRUSES (ACAV), SUBCOMMITTEE ON ARBOVIRUS LABORATORY SAFETY (1980). Laboratory safety for arboviruses and certain viruses of vertebrates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **29**, 1359–1381.

ARECHIGA-CEBALLOS N. & AGUILAR-SETIEN A. (2015). Alphaviral equine encephalomyelitis (Eastern, Western and Venezuelan). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **34**, 491–501.

ARRIGO N.C., ADAMS, A.P. & WEAVER S.C. (2010) Evolutionary patterns of eastern equine encephalitis virus in North versus South America suggest ecological differences and taxonomic revision. *J. Virol.*, **84**, 1014–1025.

BAUER R.W., GILL M.S., POSTON R.B. & KIM D. Y. (2005). Naturally occurring eastern equine encephalitis in a Hampshire wether. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 281–285.

BERGE T.O., BANKS I.S. & TIGERTT W.D. (1961). Attenuation of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by *in vitro* cultivation in guinea pig heart cells. *Am. J. Hyg.*, **73**, 209–218.

BINGHAM A.M., GRAHAM S.P., BURKETT-CADENA N.D., WHITE G.S., HASSAN H.K. & UNNASCH T.R. (2012). Detection of eastern equine encephalomyelitis virus RNA in North American snakes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **87**, 1140–1144.

BROWN T.M., MITCHELL C.J., NASCI R.S., SMITH G.C. & ROEHRIG J.T. (2001). Detection of eastern equine encephalitis virus in infected mosquitoes using a monoclonal antibody-based antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **65**, 208–213.

CALISHER C.H., SHOPE R.E., BRANDT W., CASALS J., KARABATSOS N., MURPHY F.A., TESH R.B. & WIEBE M.E. (1980). Proposed antigenic classification of registered arboviruses. I. *Togavirus Alphavirus. Intervirology*, **14**, 229–232.

- CARRERA J.-P., FORRESTER N., WANG E., VITTOR A.Y., HADDOW A.D., LÓPEZ-VERGÉS S., ABADÍA I., CASTAÑO E., SOSA N., BÁEZ C., ESTRIFEAUT D., DÍAZ Y., BELTRÁN D., CISNEROS J., CEDEÑO H. G., TRAVASSOS DA ROSA A.P., HERNANDEZ H., MARTÍNEZ-TORRES A.O., TESH R.B. & WEAVER S.C. (2013). Eastern Equine Encephalitis in Latin America. *N. Engl. J. Med.*, **369**, 732–744.
- ELVINGER F., BALDWIN C.A., LIGGETT A.D., TANK K.N., & STALLKNECHT D.E. (1996). Prevalence of exposure to eastern equine encephalomyelitis virus in domestic and feral swine in Georgia. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 481–484.
- ESHOO M.W., WHITEHOUSE C.A., ZOLL S.T., MASSIRE C., PENNELLA T.T., BLYN L.B., SAMPATH R., HALL T.A., ECKER J.A., DESAI A., WASIELOSKI L.P., LI F., TURELL M.J., SCHINK A., RUDNICK K., OTERO G., WEAVER S.C., LUDWIG G.V., HOFSTADLER S.A. & ECKER D.J. (2007). Direct broad-range detection of alphaviruses in mosquito extracts. *Virology*, **368**, 286–295.
- ESTRADA-FRANCO J.G., NAVARRO-LOPEZ R., FREIER J.E., CORDOVA D., CLEMENTS T., MONCAYO A., KANG W., GOMEZ-HERNANDEZ C., RODRIGUEZ-DOMINGUEZ G., LUDWIG G.V., WEAVER S.C. (2004). Venezuelan equine encephalitis virus, Southern Mexico. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 2113–2121.
- FARRAR M.D., MILLER D. L., BALDWIN C. A., STIVER S. L. & HALL C. L. (2005). Eastern equine encephalitis in dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 614–617.
- FRANKLIN R.P., KINDE H., JAY M.T., KRAMER L.D., GREEN E.-G.N., CHILES R.E., OSTLUND E., HUSTED S., SMITH J. & PARKER M.D. (2002). Eastern equine encephalomyelitis virus infection in a horse from California. *Emerg. Inf. Dis.*, **8**, 283–288. doi:10.3201/eid0803.010199.
- GO Y.Y., BALASURIYA U.B.R. & LEE C-K. (2014). Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clin. Exp. Vaccine Res.*, **3**, 58–77.
- GUY J.S. (1997). Arbovirus Infections. In: Diseases of Poultry, Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R., & Saif Y.M., ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 765–772.
- JOHNSON D.J., OSTLUND E.N. & SCHMITT B.J. (2003). Nested multiplex RT-PCR for detection and differentiation of West Nile virus and eastern equine encephalomyelitis virus in brain tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **15**, 488–493.
- KANG X., LI Y., LIU H., LIN F., CAI X., SUN T., CHANG G., ZHU Q. & YANG Y. (2010). A duplex real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for detecting western equine and eastern equine encephalitis viruses. *Virol J.*, **7**, 284.
- KARABATSOS N., LEWIS A.L., CALISHER C.H., HUNT A.R. & ROEHRIG J.T. (1988). Identification of Highland J virus from a Florida horse. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **39**, 603–606.
- KUMAR B., MANUJA A., GULATI B.R., VIRMANI N. & TRIPATHI B.N. (2018). Zoonotic Viral Diseases of Equines and Their Impact on Human and Animal Health. *Open Virol. J.*, **12**, 80–98.
- LAMBERT A.J., MARTIN D.A. & LANCIOTTI R.S. (2003). Detection of North American eastern and western equine encephalitis viruses by nucleic acid amplification assays. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 379–385.
- LINSSEN B., KINNEY R.M., AGUILAR P., RUSSELL K.L., WATTS D.M., KAADEN O.R. & PFEFFER M. (2000). Development of reverse transcription-PCR assays specific for detection of equine encephalitis viruses. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 527–535.
- MAIRE L.F. III, MCKINNEY R.W. & COLE F.E. JR (1970). An inactivated eastern equine encephalomyelitis vaccine propagated in chick-embryo cell culture. I. Production and testing. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **19**, 119–122.
- MCGEE E.D., LITTLETON C.H., MAPP J.B. & BROWN R.J. (1992). Eastern equine encephalomyelitis in an adult cow. *Vet. Pathol.*, **29**, 361–363.
- MEDINA G., GARZARO D.J., BARRIOS M., AUGUSTE A.J., WEAVER S.C. & PUJOL F.H. (2015). Genetic diversity of Venezuelan alphaviruses and circulation of a Venezuelan equine encephalitis virus subtype IAB strain during an interepizootic period. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **93**, 7–10.

- MONATH T.P. & TRENT D.W., eds (1981). Chapter 8: Togaviral diseases of domestic animals. *In: Comparative Diagnosis of Viral Diseases, Volume IV*. Academic Press, New York, USA, 331–440.
- MONROY A.M., SCOTT T.W. & WEBB B.A. (1996). Evaluation of reverse transcriptase polymerase chain reaction for the detection of eastern equine encephalomyelitis virus during vector surveillance. *J. Med. Entomol.*, **33**, 449–457.
- MORRIS C.D. (1989). Eastern equine encephalomyelitis. *In: The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, Vol. 3, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1–12.
- NAVARRO J.C., MEDINA G., VASQUEZ C., COFFEY L.L., WANG E., SUÁREZ A., BIRD H., SALAS M. & WEAVER S.C. (2005). Postepizootic persistence of Venezuelan equine encephalitis virus, Venezuela. *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 1907–1915.
- OBERSTE M.S., SCHMURA S.M., WEAVER S.C. & SMITH J.F. (1999). Geographic distribution of Venezuelan equine encephalitis virus subtype IE genotypes in Central America and Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **60**, 630–634.
- PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (1972). Venezuelan encephalitis. *In: Proceedings of a Workshop/ Symposium on Venezuelan Encephalitis Virus*. Sci. Publ. **243**, Washington DC, USA, 416 pp.
- PENNICK K.E., MCKNIGHT C.A., PATTERSON J.S., LATIMER K.S., MAES R.K., WISE A.G. & KIUPEL M. (2012). Diagnostic sensitivity and specificity of in situ hybridization and immunohistochemistry for Eastern equine encephalitis virus and West Nile virus in formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue of horses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **24**, 333–338.
- PISANO M.B., SECO M.P., RÉ V.E., FARIAS A.A., CONTIGIANI M.S. & TENORIO A. (2012). Specific detection of all members of the Venezuelan equine encephalitis complex: development of a RT-nested PCR. *J. Virol. Methods*, **186**, 203–206.
- POWERS A.M., OBERSTE M.S., BRAULT A.C., RICO-HESSE R., SCHMURA S.M., SMITH J.F., KANG W., SWEENEY W.P. & WEAVER S.C. (1997). Repeated emergence of epidemic/epizootic Venezuelan equine encephalitis from a single genotype of enzootic subtype ID virus. *J. Virol.*, **71**, 6697–6705.
- PURSELL A.R., MITCHELL F.E. & SEIBOLD H.R. (1976). Naturally occurring and experimentally induced eastern encephalomyelitis in calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **169**, 1101–1103.
- QUIROZ E., AGUILAR P.V., CISNEROS J., TESH R.B. & WEAVER S.C. (2009). Venezuelan equine encephalitis in Panama: Fatal endemic disease and genetic diversity of etiologic viral strains. *PLoS Negl. Trop. Dis*, **3**, 472.
- REISEN W.K. & MONATH T.P. (1989). Western equine encephalomyelitis. *In: The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, Vol. 5, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 89–137.
- SAHU S.P., ALSTAD A.D., PEDERSEN D.D. & PEARSON J.E. (1994). Diagnosis of eastern equine encephalomyelitis virus infection in horses by immunoglobulin M and G capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**, 34–38.
- SALIMI H., CAIN M.D. & KLEIN R. S. (2016). Encephalitic Arboviruses: Emergence, Clinical Presentation, and Neuropathogenesis. *Neurotherapeutics*, **13**, 514–534.
- SNEIDER J.M., KINNEY R.M., TSUCHIYA K.R. & TRENT D.W. (1993). Molecular evidence that epizootic Venezuelan equine encephalitis (VEE) I-AB viruses are not evolutionary derivatives of enzootic VEE subtype I-E or II viruses. *J. Gen. Virol.*, **74**, 519–523.
- TATE C.M., HOWERTH E.W., STALLKNECHT D.E., ALLISTON, A.B., FISHER J.R. & MEAD D.G. (2005). Eastern equine encephalitis in a free-ranging white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Wildl. Dis.*, **41**, 241–245.
- TUTTLE A.D., ANDREADIS T.G., FRASCA S. JR & DUNN J.L. (2005). Eastern equine encephalitis in a flock of African penguins maintained at an aquarium. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **226**, 2059–2062.
- UNITED STATES CODE OF FEDERAL REGULATIONS (2000). Encephalomyelitis vaccine: Eastern and Western killed virus. Title 9, Part 113, Section 113.207. US Government Printing Office, Washington DC, USA, 601–602.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (2009). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. (BMBL) 5th Edition. <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/index.htm>.

VINA-RODRIGUEZ A., EIDEN M., KELLER M., HINRICHS W. & GROSCHUP M.H. (2016). A quantitative real-time RT-PCR assay for the detection of Venezuelan equine encephalitis virus utilizing a universal alphavirus control RNA. *Biomed Res Int.*, 8543204.

VODKIN M.H., McLAUGHLIN G.L., DAY J.F., SHOPE R.E. & NOVAK R.J. (1993). A rapid diagnostic assay for eastern equine encephalomyelitis viral-RNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **49**, 772–776.

WALTON T.E. (1981). Venezuelan, eastern, and western encephalomyelitis. *In: Virus Diseases of Food Animals. A World Geography of Epidemiology and Control. Disease Monographs, Vol. 2*, Gibbs E.P.J., ed. Academic Press, New York, USA, 587–625.

WALTON T.E., ALVAREZ O. JR, BUCKWALTER R.M. & JOHNSON K.M. (1973). Experimental infection of horses with enzootic and epizootic strains of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *J. Infect. Dis.*, **128**, 271–282.

WALTON T.E. & GRAYSON M.A. (1989). Chapter 46. Venezuelan equine encephalomyelitis. *In: The Arboviruses: Epidemiology and Ecology, Vol. 4*, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 203–231.

WANG E., BARRERA R., BOSHELL J., FERRO C., FREIER J.E., NAVARRO J.C., SALAS R., VASQUEZ C. & WEAVER S.C. (1999). Genetic and phenotypic changes accompanying the emergence of epizootic subtype IC Venezuelan equine encephalitis viruses from an enzootic subtype ID progenitor. *J. Virol.*, **73**, 4266–4271.

WANG E., PAESSLER S., AGUILAR P.V., CARRARA A.S., NI H., GREENE I.P. & WEAVER S.C. (2006). Reverse transcription-PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection and differentiation of alphavirus infections. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 4000–4008.

WEAVER S.C., FERRO C., BARRERA R. BOSHELL J. & NAVARRO J.C. (2004) Venezuelan equine encephalitis. *Annu. Rev. Entomol.*, **49**, 141–174.

WEAVER S.C., HAGENBAUGH A., BELLEW L.A., GOUSSET L., MALLAMPALLI V., HOLLAND J.J. & SCOTT T.W. (1994). Evolution of Alphaviruses in the eastern equine encephalomyelitis complex. *J. Virol.*, **68**, 158–169.

WEAVER S.C., PFEFFER M., MARRIOTT K., KANG W. & KINNEY R.M. (1999). Genetic evidence for the origins of Venezuelan equine encephalitis virus subtype IAB outbreaks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **60**, 441–448.

WEAVER S.C., WINEGAR R., MANGER I.D. & FORRESTER N.L. (2012). Alphaviruses: Population genetics and determinants of emergence. *Anitviral Res.*, **94**, 242–257.

WHITE G., OTTENDORFER C., GRAHAM S. & UNNASCH T.R. (2011) Competency of reptiles and amphibians for eastern equine encephalitis virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **85**, 421–425.

ZACKS M.A. & PAESSLER S. (2010). Encephalitic alphaviruses. *Vet. Microbiol.*, **140**, 281–286.

ZEHMER R.B., DEAN P.B., SUDIA W.D., CALISHER C.H., SATHER G.E. & PARKER R.L. (1974). Venezuelan equine encephalitis epidemic in Texas, 1971. *Health Serv. Rep.*, **89**, 278–282.

*
* *

NB: En el momento de la publicación (2022) no existían Laboratorios de Referencia de la OIE para la encefalomiелitis equina (del Este, del Oeste y venezolana)

(puede consultarse la página web de la OIE para obtener la lista actual:

<https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

NB: EL CAPÍTULO SOBRE LA ENCEFALOMIELITIS EQUINA (DEL ESTE Y DEL OESTE) FUE ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991; EL CAPÍTULO SOBRE LA ENCEFALOMIELITIS VENEZOLANA FUE ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2021.