

## ENFERMEDADES DE NIPAH Y HENDRA

---

### RESUMEN

Los virus de Hendra (VHe) y de Nipah (VNi) surgieron en la última década del siglo XX como causa de brotes de una enfermedad neurológica y respiratoria que afectó a varias especies animales y al hombre. En 1994, el VHe causó una enfermedad respiratoria grave y la muerte de 13 caballos y de un entrenador de caballos en un establo de Brisbane, Australia. 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. Se sacrificaron más de un millón de cerdos para detener la propagación de la enfermedad. El VHe ha causado la muerte de cuatro de siete personas infectadas en Australia, mientras que se han dado 585 casos de VNi en humanos, provocando unos 200 muertos en Malasia, Singapur, Bangladesh y la India. La mayor parte de las encefalitis por VNi mortales que han tenido lugar recientemente se han producido en Filipinas, donde han muerto 9 de los 17 casos humanos. Los murciélagos frugívoros (zorros voladores) del género *Pteropus* son los hospedadores naturales de ambos virus.

La infección de caballos por el VHe se caracteriza por la aparición progresiva de fiebres altas, hinchazón facial, dificultad respiratoria grave y, finalmente, una abundante secreción nasal espumosa. También puede observarse ataxia y mioclonía. Algunos caballos presentan signos neurológicos, mientras que otros empiezan el cuadro clínico con signos de tipo cólico. Las observaciones postmórtem más frecuentes son una dilatación de los vasos linfáticos pulmonares, y el edema y la congestión pulmonar. La lesión subyacente consiste en una degeneración generalizada de los capilares sanguíneos de varios órganos. En capilares y arteriolas se observan frecuentemente células endoteliales sincitiales que contienen el antígeno vírico. La infección equina por el VHe no siempre provoca la muerte y algunos caballos que presentan signos clínicos sobreviven. El virus Hendra no parece ser muy contagioso entre caballos, y para la transmisión parece ser necesario el contacto directo. Los caballos infectados en pastos casi nunca transmiten el virus. Sin embargo, la transmisión parece producirse con mayor facilidad en ambientes cerrados, como los establos.

La infección porcina por el VNi es muy contagiosa, pero inicialmente no se identificó como una enfermedad nueva porque ni la morbilidad ni la mortalidad eran destacadas y los signos clínicos no eran significativamente diferentes de los de otras enfermedades porcinas conocidas de Malasia. Teniendo en cuenta las observaciones que se realizaron durante el brote y durante las infecciones experimentales, la infección de cerdos por el VNi se caracteriza por fiebre con afectación respiratoria y, a menudo, también neurológica, pero muchas infecciones son subclínicas. Algunos animales infectados presentan una inusual tos fuerte y seca (sonido semejante a ladridos). Se han notificado casos de aborto en cerdas, y tanto cerdas como verracos pueden morir de forma hiperaguda. Pueden encontrarse lesiones inmunohistoquímicas en el sistema respiratorio (traqueítis y neumonía bronquial e intersticial) o en el encéfalo (meningitis) de los animales infectados, o bien en ambos lugares. En capilares sanguíneos, vasos linfáticos y el epitelio respiratorio se observan células sincitiales que contienen antígeno vírico.

Ambos virus afectan a los animales de compañía. Experimentalmente, el VHe provoca en gatos una enfermedad respiratoria similar a la observada en los caballos, mientras que en los perros también puede cursar con signos clínicos. La infección natural de perros con el VNi causa un síndrome parecido al moquillo, con una alta mortalidad; existe evidencia serológica de que algunos perros sobreviven a la infección. De manera experimental, el VNi origina una enfermedad semejante a la producida por el VHe en los gatos. Se ha demostrado la presencia de células

endoteliales sincitiales que contienen el antígeno vírico en las infecciones de gatos debidas a ambos virus y en la infección de perros por el VNi.

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 natural: el VNi del cerdo y el VHe de los caballos. Sin embargo, las investigaciones de los brotes de VNi en humanos de Bangladesh han apuntado a la infección humana por murciélagos pterópidos sin hospedador intermediario/amplificador. No se ha observado la transmisión del VHe ni del VNi entre humanos de Malasia ni de Singapur, pero se sospecha que en los brotes recientes de VNi de Bangladesh ha tenido lugar en pocas ocasiones.

El VHe y el VNi son miembros estrechamente relacionados del género *Henipavirus*, que pertenece a la subfamilia *Paramyxovirinae* de la familia *Paramyxoviridae*. Tanto el VHe como el VNi son agentes patógenos peligrosos para el ser humano, y por ello, según los análisis de la gestión del riesgo de los laboratorios, se considera que requieren una contención de nivel 4 para la bioseguridad (BSL4). Es importante que las muestras procedentes de animales sospechosos se transporten a laboratorios autorizados solo en condiciones biológicamente seguras y de acuerdo con las normas internacionales.

**Identificación del agente:** Tanto el VHe como el VNi pueden propagarse en varios 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 después del aislamiento del virus comprenden la inmunotinción de células infectadas, la neutralización con antisueros específicos contra los virus y la caracterización molecular. Como pruebas de diagnóstico, en la actualidad se dispone de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y de la RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR).

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. Los envíos para el análisis mediante IHC deben incluir muestras de pulmón, bazo, riñón y encéfalo a varios niveles, incluidas las meninges. En hembras gestantes o en casos de aborto, deben analizarse muestras de útero, placenta y tejidos fetales, según corresponda. Para el aislamiento vírico y la detección molecular del virus, deben tomarse muestras de tejido fresco de los órganos infectados mencionados, y/o hisopos de orina, de la garganta o nasales.

**Pruebas serológicas:** Se dispone de pruebas de neutralización vírica (VN) y de enzimo-inmunoanálisis (ELISA). Actualmente, 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. Puede conocerse qué anticuerpo neutralizante (de VHe o de VNi) contiene el suero problema averiguando si neutraliza en mayor grado el virus homólogo o el heterólogo. Esto puede que no sea un impedimento esencial en situaciones de brotes en las que se conozca el agente causal, pero las muestras de suero que procedan de casos sospechosos o de áreas del mundo distintas de Australia y Malasia se deben someter a VN, tanto con el VHe como con el VNi. La relación serológica entre el VHe y el VNi permite asegurar que tanto los ELISA en los que se emplea el antígeno del VHe como aquellos en los que se emplea el del VNi permiten detectar anticuerpos producidos frente a ambos virus.

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

## A. INTRODUCCIÓN

El virus Hendra (VHe) y el virus Nipah (VNi) forman parte de la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, género *Henipavirus*. Tienen propiedades morfológicas y fisicoquímicas características de los paramixovirus. Son pleomórficos y tienen envoltura, y nucleocápsidas en espinapez. Los viriones miden 40–600 nm de diámetro. Las espículas de la glucoproteína y de la proteína de fusión protruyen a través de una

envoltura lipídica. Tanto el VHe como el VNi tienen una genoma de ARN de polaridad negativa, monocatenario y no segmentado (18,2 kb), que consiste en seis genes que codifican seis proteínas estructurales principales, que son las siguientes: N (proteína de la nucleocápsida), P (fosfoproteína), M (proteína de la matriz), F (proteína de fusión), G (glucoproteína) y L (proteína grande).

El VHe y el VNi tienen lugar de forma natural como virus de murciélagos frugívoros, cuyo nombre común es “zorros voladores”, y que son miembros del género *Pteropus*, familia *Pteropodidae*. Se han encontrado anticuerpos contra el VHe en las cuatro especies de *Pteropus* australianos, y su prevalencia varía en función del tiempo y del lugar. Los estudios serológicos relativos a los anticuerpos contra el VNi muestran seroprevalencias de hasta un 75% en los murciélagos pterópidos de Malasia (Sohayati *et al.*, 2011; 2013). Posteriormente se han detectado anticuerpos contra el VNi o contra virus estrechamente relacionados con aquél en murciélagos pterópidos en la mayor parte de su territorio: Bangladesh, Camboya (Olson *et al.*, 2002; Reynes *et al.*, 2005), Indonesia (Sendow *et al.*, 2006), Madagascar (Lehle *et al.*, 2007) y Tailandia (Wacharapluesadee *et al.*, 2005). Se ha aislado el VHe de zorros voladores de Australia (Halpin *et al.*, 2000) y el VNi de zorros voladores de Malasia y Camboya (Chua *et al.*, 2002; Reynes *et al.*, 2005; Sohayati *et al.*, 2011). Se ha detectado ARN del VNi mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en la orina, saliva y sangre de murciélagos pterópidos de Tailandia (Wacharapluesadee & Hemachudha, 2007; Wacharapluesadee *et al.*, 2005). En Ghana, 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, aunque no se han comunicado casos humanos de VNi en ninguna región fuera del sudeste asiático.

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 no se parecía lo suficiente a los morbilivirus como para incluirlo en este género. Ha habido otros dos casos de infección equina mortal por VHe en el Norte de Queensland y otros casos de infección en humanos. Dos caballos desarrollaron una enfermedad aguda y murieron casi 1 mes antes del brote de Brisbane, pero se determinó que el VHe era la causa de la muerte solo después de que el dueño del caballo, quien probablemente contrajo el VHe durante la necropsia de los caballos, muriera 13 meses más tarde por una encefalitis mediada por el VHe (Rogers *et al.*, 1996). Desde entonces, ha habido 40 brotes más en más de 75 caballos, pero solo dos han afectado a más de tres caballos. Los siete casos humanos han dado lugar a cuatro muertes (57%). 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 ha causado una baja mortalidad entre los cerdos de Malasia desde 1996, pero permaneció desconocido hasta 1999, año en el que surgió como agente causal de un brote de encefalitis en humanos que había comenzado en 1998 (Chua *et al.*, 2000; Nor *et al.*, 2000). En contraste con la enfermedad respiratoria equina causada por el VHe, que fue frecuentemente mortal pero caracterizada por una transmisibilidad baja (Williamson *et al.*, 1998), la enfermedad respiratoria provocada por el VNi en cerdos fue a menudo subclínica y muy contagiosa, propiedades que condujeron a la diseminación rápida del virus entre la población porcina de Malasia y obligó a las autoridades a optar por el desvieje como el principal medio para controlar la propagación (Nor *et al.*, 2000). Se eliminaron más de un millón de cerdos; 106 de 267 (39%) hombres 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; Paton *et al.*, 1999). Durante ese brote, en las explotaciones porcinas también se infectaron gatos, perros y caballos (Hooper *et al.*, 2001; Nor *et al.*, 2000), pero no fueron infecciones epidemiológicamente significativas.

Con posterioridad, han tenido lugar nuevos 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. En los brotes de 2001 y 2003 no se comprobó que las infecciones humanas se originaran en animales domésticos, pero se hallaban presentes murciélagos pterópidos del tipo *Pteropus giganteus* que poseían anticuerpos capaces de neutralizar el virus Nipah. Los estudios de casos agrupados y secuenciales en el tiempo indicaron que la transmisión entre humanos es posible aunque infrecuente. En otro brote que tuvo lugar en 2004, en el que 27 de los 36 (75%) humanos infectados perecieron, se hallaron pruebas de la transmisión entre humanos y estudios serológicos detectaron la presencia de murciélagos frugívoros seropositivos en la localidad. Se ha detectado como probable vía de transmisión desde los reservorios de animales salvajes a los humanos la ingesta de zumo natural de palmera datilera contaminado con la saliva, la orina o los excrementos de murciélagos frugívoros (Luby *et al.*, 2006). Como consecuencia de estos brotes constantes, se estima que hasta el momento han tenido lugar en Malasia, Singapur, Bangladesh y la India más de 585 casos de VNi en humanos, de los que han muerto en torno a 334.

En 2014, se notificó un brote de casos humanos de VNi en Filipinas epidemiológicamente distinto, en el que murieron 9 de las 17 personas infectadas (Ching *et al.*, 2015). En este brote, las personas infectadas habían

estado inicialmente expuestas a caballos con encefalitis aguda y habían sido sacrificados y consumidos por personas que después habían contraído la infección. Se sospechó de alguna transmisión entre humanos. También resultaron afectados perros y gatos.

El diagnóstico de la enfermedad causada por los Henipavirus se realiza mediante el aislamiento del virus, la detección del ARN vírico en muestras clínicas o postmórtem, o la detección del antígeno vírico en muestras de tejidos tomadas durante la necropsia (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, pero 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).

## 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
<b>Identificación del agente<sup>1</sup></b>						
Aislamiento del virus	+	+	–	+++		–
RT-PCR y qRT-PCR	+	+	++	+++	++	–
IHC	–	–	–	++	–	–
IFA	–	–	–	++	–	–
<b>Detección de respuesta inmunitaria<sup>2</sup></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; qRT-PCR = RT-PCR en tiempo real;

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

VN = prueba de la neutralización del virus.

1 Se recomienda utilizar una combinación de métodos de identificación del agente con la misma muestra clínica.

2 Es suficiente con una de las pruebas serológicas de la lista.

## 1. Bioseguridad en el laboratorio

El VHe y el VN<sub>i</sub> 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 (OMS, 2004). 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.

La propagación de virus, en concreto, debe realizarse en unas condiciones estrictas y adecuadas que prevengan la infección accidental del personal de laboratorio. Durante el aislamiento primario del virus a partir de muestras 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, utilizando cabinas de seguridad de clase II con un equipo de protección personal adecuado o bien cabinas de clase III. 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. Identificación del agente etiológico

### 2.1. Aislamiento y caracterización del virus

El aislamiento del virus facilita enormemente los procedimientos de identificación, y el diagnóstico definitivo 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 VN<sub>i</sub>. Pueden emplearse técnicas moleculares de detección que no requieran la manipulación 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 (Daniels *et al.*, 2007).

#### 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.*, 2000). En los casos de animales vivos, siempre deben enviarse hisopos (nasales u orofaríngeos) y suero. 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. 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  $-20^{\circ}\text{C}$ .

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 VN<sub>i</sub> crecen rápidamente en muchos cultivos celulares hasta alcanzar títulos altos. Se ha observado que las células de riñón de mono verde africano (Vero) 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 una cabina de Clase III o en una de Clase II, pero en este segundo caso el operario deberá llevar el correspondiente equipo de protección personal. Los tubos empleados deberán disponer de anillas en O, y un hilo externo. A continuación, se llevará a cabo la clarificación del homogenado mediante una centrifugación en un rotor con tapa de seguridad, a 300 **g** y 4°C, antes de añadir 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) Inmuntinción de células fijadas

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

#### a) Procedimiento analítico

En condiciones 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. 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. Inmuntinción comparativa

La posterior identificación de una cepa de henipavirus como VHe o VNi se realiza mediante una inmuntinción comparativa, como se describe en este apartado. Es necesario comparar la cepa

con cultivos estándar tanto de VHe como de VNi, y, por lo tanto, todo el trabajo deberá desarrollarse con procedimientos que permitan controlar los riesgos biológicos. Se titulan los virus control y problema en placas de células Vero de 96 pocillos y, tras 18–24 horas, los focos de infección se detectan inmunológicamente en células fijadas con acetona empleando antisuero antivírico. Los títulos víricos se expresan como unidades formadoras de focos (UFF)/ml.

### 2.2.2. Prueba de la inmunofluorescencia

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

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

### 2.2.3. Neutralización en placa de microtitulación

Para este procedimiento es necesario disponer de anti-suero específico del VHe y del VNi, así como de virus de reserva. Los VHe y VNi de reserva y el henipavirus no identificado se diluyen, y se añaden réplicas de cada virus que contengan alrededor de 100 DICT<sub>50</sub> 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 × 10<sup>4</sup> 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.

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

La RT-PCR en tiempo real es una prueba especialmente sensible y útil para la detección del genoma del *henipavirus* en muestras (véase la tabla 2). Los procedimientos y cebadores utilizados en la prueba dependen de la plataforma tecnológica y la química relacionada que se utilicen en cada laboratorio (Mungall *et al.*, 2006; Wacharapluesadee y Hemachudha, 2007). Las pruebas Taqman de detección del gen M (Smith *et al.*, 2001) y del gen N (Feldman *et al.*, 2009) del VHe, así como de detección del gen n del VNi, son las principales pruebas de diagnóstico.

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

Prueba	Oligo	Nombre	Secuencia del cebador (5'–3')	Marcador de la sonda (5'–3')
HeV_TQM_M	Directo	HeV M 5755F	CTT-CGA-CAA-AGA-CGG-AAC-CAA	
	Inverso	HeV M 5823R	CCA-GCT-CGT-CGG-ACA-AAA-TT	
	Sonda	HeV M 5778P	TGG-CAT-CTT-TCA-TGC-TCC-ATC-TCG-G	FAM-TAMRA

Prueba	Oligo	Nombre	Secuencia del cebador (5'-3')	Marcador de la sonda (5'-3')
HeV_TQM_N	Directo	HeV N119F	GAT-ATI-TTT-GAM-GAG-GCG-GCT-AGT-T	
	Inverso	HeV N260R	CCC-ATC-TCA-GTT-CTG-GGC-TAT-TAG	
	Sonda	HeV N198-220P	CTA-CTT-TGA-CTA-CTA-AGA-TAA-GA	FAM-MGBNFQ
NiV_TQM_N	Directo	NiV_N_1198F	TCA-GCA-GGA-AGG-CAA-GAG-AGT-AA	
	Inverso	NiV_N_1297R	CCC-CTT-CAT-CGA-TAT-CTT-GAT-CA	
	Sonda	NiV_N_1247comp	CCT-CCA-ATG-AGC-ACA-CCT-CCT-GCA-G	FAM-TAMRA

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

Para la detección del VHe también pueden utilizarse dos PCR convencionales semi-anidadas, que tienen por objetivo los genes M y P. Estas dos pruebas se utilizan de manera complementaria para confirmar los resultados de las pruebas Taqman cuando estas últimas 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	PCR primaria	Directo	HeV M 5481F	GCC-CGC-TTC-ATC-ATC-TCT-T	300 pb
		Inverso	HeV M 5781R1	CCA-CTT-TGG-TTC-CGT-CTT-TG	
	PCR semi-anidada	Directo	HeV M 5481F	GCC-CGC-TTC-ATC-ATC-TCT-T	211 pb
		Inverso	HeV M 5691R2	TGG-CAT-CTT-TCA-TGC-TCC-ATC-TCG-G	
Gen P del VHe	PCR primaria	Directo	HeV P 4464F1	CAG-GAG-GTG-GCC-AAT-ACA-GT	335 pb
		Inverso	HeV P 4798R	GAC-TTG-GCA-CAA-CCC-AGA-TT	
	PCR semi-anidada	Directo	HeV P 4594F2	TCA-ACC-ATT-CAT-AAA-CCG-TCA-G	205 pb
		Inverso	HeV P 4798R	GAC-TTG-GCA-CAA-CCC-AGA-TT	

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

i) RT-PCR primaria

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

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

1x 68°C durante 7 minutos

ii) PCR semi-anidada

1x 95°C durante 5 minutos

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

1x 72°C durante 7 minutos

**Tabla 4.** Cebadores utilizados para la PCR convencional y la secuenciación del NiV

Gen M del VNi	RT-PCR primaria	Directo	NiV M 5659F	TGG-AAT-CTA-CAT-GAT-TCC-ACG-AAC-CAT-G	279 pb
		Inverso	NiV M 5942R1	TAA-TGT-GGA-GAC-TTA-GTC-CGC-CTA-TG	
	PCR semi-anidada	Directo	NiV M 5659F	TGG-AAT-CTA-CAT-GAT-TCC-ACG-AAC-CAT-G	250pb
		Inverso	NiV M 5909R2	GTG-AAA-ACT-GCA-ATT-TCA-TCC-TAT-CAA-TC	

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

- i) RT-PCR primaria
  - 1x 48°C durante 30 minutos
  - 1x 94°C durante 2 minutos
  - 40x 94°C durante 30 segundos, 52°C durante 30 segundos, 68°C durante 45 segundos
  - 1x 68°C durante 7 minutos
- ii) PCR anidada
  - 1x 95°C durante 5 minutos
  - 30x 94°C durante 30 segundos, 52°C durante 30 segundos, 72°C durante 45 segundos
  - 1x 72°C durante 7 minutos

Se han descrito varias PCR convencionales para la detección del VNi, la mayor parte de las cuales tiene por objetivo el gen N. Para más información, puede consultarse la publicación de Wacharapluesadee y Hemachudha (2007). Feldman *et al.*, 2009 describen una PCR semi-anidada que tiene por objetivo el gen L.

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; Middleton *et al.*, 2002; Mungall *et al.*, 2006). 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”. 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 cromagenes.

#### 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 tiñe 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<sub>i</sub>. Los sueros pueden irradiarse con rayos gamma (6 kiloGreys) o diluirse a 1/5 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenga Tween 20 al 0,5% y Triton-X 100 al 0,5% e inactivados por calor a 56°C durante 30 minutos. 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) (Kaku *et al.*, 2009; Tamin *et al.*, 2009) 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<sub>i</sub> 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 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 VNi, 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.

#### 4.2. Enzimoimmunoanálisis

Los antígenos de los Henipavirus obtenidos en cultivos de tejidos para las pruebas de enzimoimmunoanálisis (ELISA) se irradian con 6 kiloGreys 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). Más recientemente, se ha aplicado una forma soluble recombinante expresada de proteína G de virus Hendra (Bossart *et al.*, 2005) para la mejora de los enzimoimmunoanálisis de detección del virus Hendra (McNabb *et al.*, 2014).

En el programa nacional de vigilancia porcina de Malasia de 1999 (Daniels *et al.*, 2000) se empleó un formato de ELISA indirecto similar en el que el antígeno procedía de células infectadas por el VNi 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 VNi y un antígeno control derivado de células Vero no infectadas. En el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, EE.UU., el enfoque no solo ha sido disponer de un ELISA indirecto para detectar la IgG sino también utilizar un ELISA de captura para detectar la IgM. Para el VNi, también se ha descrito (Yu *et al.*, 2006) un ELISA en el que se utiliza antígeno recombinante de la nucleocápsida, y que también está configurado para la detección de la IgG o la IgM.

La especificidad del ELISA indirecto para el VNi (98,4%) (Ong *et al.*, 2000) significa que en programas de vigilancia, la prueba producirá falsos positivos. Esto puede que no sea un problema importante de cara a afrontar un brote de VNi en el que se infecta un alto porcentaje de cerdos y el propósito de la vigilancia es detectar explotaciones infectadas. Sin embargo, este nivel de especificidad de la prueba crea un problema en muestras de brote o si el número de muestras a analizar es escaso. Si un resultado positivo por ELISA es indicativo de una auténtica infección, la falta de respuesta puede conducir a una propagación del virus y provocar víctimas humanas mortales. Por el contrario, el iniciar medidas de control en respuesta a un ELISA positivo falso podría suponer un derroche de recursos (Daniels *et al.*, 2001). 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 VNi 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. Procedimiento analítico

En el Laboratorio de Sanidad Animal de Australia se dispone de la metodología detallada para la producción y/o suministro de los antígenos VNi 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 Triton X-100 al 0,5% (v/v) y Tween 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 (como Virkon al 1%) 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 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 VNi y a dos pocillos que contengan el antígeno control, células Vero no infectadas, como se describe en el paso xiv.
- ii) Procedimiento para el 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 incuba 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 Tween 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 leche desnatada en polvo (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 xi) a cada pocillo, como se indica en el formato más adelante. Se añaden 100 µl de PBS que contenga un 5% de suero de pollo y un 5% de leche desnatada en polvo 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 leche desnatada en polvo 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 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 dudosos
- Los sueros dudosos y los positivos deberán analizarse mediante neutralización vírica.

### 4.3. Pruebas con microesferas

Los siguientes métodos, validados, son ejemplos de este tipo de pruebas<sup>3</sup>.

Se han desarrollado dos pruebas serológicas con microesferas multiplexadas empleando la tecnología de las microesferas magnéticas (Luminex), que permiten la identificación de anticuerpos contra el VHe y el VN<sub>i</sub> en un solo ensayo (Bossart *et al.*, 2007; McNabb *et al.*, 2014). Ambas pruebas miden los anticuerpos contra la glucoproteína soluble recombinante expresada (sG) del VHe y del VN<sub>i</sub>. 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 VN<sub>i</sub> 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 biotilada y Estreptavidina-ficoeritrina (S-PE). En el caso de la prueba de bloqueo, los sueros deben competir con el ephrinb2 biotilado 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 una máquina Luminex, y los resultados se registran como la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) de 100 microesferas. En estas pruebas se utilizan reactivos completamente recombinantes y pueden llevarse a cabo con un relativo nivel de bioseguridad, mientras que el ELISA clásico exige más atención a la gestión del riesgo biológico, sobre todo para la producción del antígeno. 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 las microesferas MagPlex (Luminex corp., que se suministran a razón de  $1,25 \times 10^7$  microesferas/ml) para la reacción de unión a la proteína (normalmente, para el VHe se utilizan microesferas del número 29, para el VN<sub>i</sub>, microesferas del número 30). 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 MagPlex #28 & #30 ( $3,75 \times 10^6$  microesferas) a tubos Sarstedt 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) Se prepara EDC (Pierce) y S-NHS (Pierce) en tampón de activación de microesferas inmediatamente antes de su uso a una concentración de 50 mg/ml (20 µl tampón/mg

<sup>3</sup> Se especifican los reactivos comerciales para ayudar a los laboratorios que deseen establecer esta técnica. Ello no implica que la OIE apoye especialmente ninguno de estos productos, y pueden utilizarse otros productos siempre que estén validados.

- 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 un conjunto de 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 Luminex de unión para Henipavirus

- i) Procedimiento 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 NUNC 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 biotilada (Pierce) a 1/500 (2 µg/ml) y la proteína G biotilada (Pierce) 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 (QIAGEN) 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 la máquina y el software Luminex correspondientes.

ii) Interpretación de los resultados

Los resultados se pueden interpretar a partir de los valores de MFI sin más, 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 > 1000 o un %P >5 debe volver a analizarse en la prueba de unión y en la de bloqueo. Si sigue siendo positiva, deberá analizarse de nuevo mediante VN para confirmar el resultado.

#### 4.3.3. Procedimiento de la prueba Luminex de bloqueo para Henipavirus

- i) Procedimiento analítico
  - a) Se escogen microesferas previamente unidas a sG de VHe y de VN<sub>i</sub>. 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 NUNC 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 (RnD Systems) 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 (QIAGEN) 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 la máquina y el software Luminex correspondientes.
- ii) Interpretación de los resultados

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

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

#### 4.4. DIVA

Ahora que existe una vacuna contra el VHe para caballos, parece interesante poder diferenciar entre caballos vacunados y caballos infectados de forma natural no vacunados. Clásicamente, la estrategia DIVA se ha basado en la premisa de que los animales vacunados solo tendrán anticuerpos contra la/s proteína/s vírica/s que se hayan utilizado en la vacuna (en el caso del VHe, la proteína G), mientras que los animales infectados de forma natural tendrán anticuerpos contra todas las proteínas víricas, tanto estructurales como no estructurales. No obstante, los resultados de tales pruebas serológicas deben interpretarse con cautela. Experimentalmente, se ha observado que en el caso de los hurones no todos los individuos generan una respuesta inmunitaria a todas las proteínas del HVe que sea

detectable con los sistemas convencionales (Middleton D., datos no publicados). En concreto, los perfiles serológicos de los animales infectados pero no vacunados podrían no ser distinguibles de los perfiles de los que están vacunados.

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

### Vacunas veterinarias para henipavirus

#### 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.

#### 2. Vacuna preparada con la subunidad soluble de la glucoproteína G de henipavirus

En estudios en los que se ha utilizado el VNi en gatos (Mungall *et al.*, 2006) y monos (Bossart *et al.*, 2012) y el VHe en hurones (Pallister *et al.*, 2011) se ha observado que la vacuna preparada con la subunidad soluble de la glucoproteína G (HeVsG) podría prevenir no solo frente a la enfermedad sino a menudo también frente a la infección en animales expuestos a dosis de VNi o VHe que, de lo contrario, resultarían letales. La vacuna para los caballos se ha formulado empleando un adyuvante comercial (Zoetis). La glucoproteína G de la superficie de henipavirus expresada tiene la función crucial de iniciar la infección uniéndose a receptores de las células hospedadoras, de tal forma que los anticuerpos dirigidos contra esta proteína pueden neutralizar el virus. La vacuna se liberó bajo un Permiso de Uso Menor en Australia en noviembre de 2012, y solo la pueden administrar veterinarios acreditados. Para la inmunización inicial deben administrarse dos dosis con un intervalo de 3 semanas entre ellas a caballos que tengan como mínimo cuatro meses de edad. Para que el efecto persista, actualmente el fabricante recomienda revacunar cada 6 meses con una dosis.

#### 3. Vacunas experimentales

En las vacunas experimentales actuales para la protección frente a la infección por el VNi se ha incluido principalmente la glucoproteína (G) y/o la proteína de fusión (F) del VNi como agentes inmunógenos, y se han utilizado en distintas plataformas, como vacunas de ADN, vacunas de subunidades, vectores no replicantes o vectores replicantes. En la mayoría de los casos, para que la vacuna sea efectiva resulta necesaria una estrategia de vacunación inicial con una o más revacunaciones, lo cual no favorecería su uso en una situación de emergencia debido a la rápida propagación del agente durante los brotes. Se ha evaluado un vector vacunal vivo-atenuado que consiste en ciertos virus recombinantes de la estomatitis vesicular (VEVr) que expresan las glucoproteínas (G o F) o la nucleoproteína (N) del VNi. La vacunación de hámsteres sirios con una dosis única de los vectores vacunales VEVr dio lugar a respuestas inmunitarias humorales fuertes, y solo se hallaron actividades neutralizantes en los animales vacunados con VEVr que expresaran las proteínas G o F del VNi, lo cual sugiere que estas pueden ser las principales candidatas a vacunas de emergencia para utilizar en casos de brote del VNi. Un constructo similar, que consiste en vectores vacunales preparados con virus de la estomatitis vesicular (VEV) de replicación defectuosa y que expresan la glucoproteína de fusión (F) o de unión (G) del VNi, protegió a hámsteres vacunados con una dosis única frente a dosis más de 1000 veces superiores a la LD<sub>50</sub> del VNi.

## BIBLIOGRAFÍA

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.

BOSSART K.N., MCEACHERN J.A., HICKEY A.C., CHOUDHRY V., DIMITROV D.S., EATON B.T. & WANG L.F. (2007). Neutralization assays for differential henipavirus serology using Bio-Plex protein array systems. *J. Virol. Methods*, **142**, 29–40.

BOSSART K.N., ROCKX B., FELDMANN F., BRINING D., SCOTT D., LACASSE R., GEISBERT J.B., FENG Y.R., CHAN Y.P., HICKEY A.C., BRODER C.C., FELDMANN H. & GEISBERT T.W. (2012). A Hendra virus G glycoprotein subunit vaccine protects African green monkeys from Nipah virus challenge. *Sci. Transl. Med.*, **4** (146).

- CHING P.K.G., DE LOS REYES V.C., SUCALDITO M.N., TAYAG E., COLUMNNA-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. & AFOXWELL 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.
- DANIELS P., AZIZ J., KSIAZEK T.G., ONG B.L., BUNNING M.J.B., FIELD H., OLSON J., HOFFMAN D., BOLOU J. & OZAWA Y. (2000). Nipah virus – developing a regional approach. *In: Comprehensive Reports on Technical Items presented to the International Committee or Regional Commissions. OIE, Paris, France, 2207–2217.*
- DANIELS P., HALPIN K., HYATT A. & MIDDLETON D. (2007). Infection and disease in reservoir and spillover hosts: determinants of pathogen emergence. *Curr. Top. Immunol. Microbiol.*, **315**, 113–131.
- DANIELS P., KSIAZEK T. & EATON B.T. (2001). Laboratory diagnosis of Nipah and Hendra virus infections. *Microbes Infect.*, **3**, 289–295.
- 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.
- 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.
- IEHLE C., RAZAFITRIMO G., RAZAINIRINA J., ANDRIAHOLINIRINA N., GOODMAN S.M., FAURE C., GEORGES-CORBOT M-C., ROUSSET D. & REYNES J-M. (2007). Henipavirus and Tioman virus antibodies in pteropid bats, Madagascar. *Emerg. Infect Dis.*, **13**, 159–161.
- 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.
- LUBY S.P., RAHMAN M., HOSSAIN M.J., BLUM L.S., HUSAIN M.M., GURLEY E., KHAN R., AHMED B.N., RAHMAN S., NAHAR N., KENAH E., COMER J.A. & KSIAZEK T.G. (2006). Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.*, **12**, 1888–1894.
- MARSH G.A., HAINING J., HANCOCK T.J., ROBINSON R., FOORD A.J., BARR J.A., RIDDELL S., HEINE H.G., WHITE J.R., CRAMERI G., FIELD H.E., WANG L.F. & MIDDLETON D. (2011). Experimental infection of horses with Hendra virus/Australia/horse/2008/Redlands. *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 2232–2238.
- MARSH G.A., DE JONG C., BARR J.A., TACHEDJIAN M., SMITH C., MIDDLETON D., YU M., TODD S., FOORD A.J., HARING V., PAYNE J., ROBINSON R., BROZ I., CRAMERI G., FIELD H.E. & WANG LF. (2012). Cedar virus: a novel Henipavirus isolated from Australian bats. *PLoS Pathog*, **8**, e1002836.
- MCNABB L., 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.
- MIDDLETON D.J., WESTBURY H.A., MORRISSY C.J., VAN DER HEIDE B.M., RUSSELL G.M., BRAUN M.A. & HYATT A.D. (2002). Experimental Nipah virus infection in pigs and cats. *J. Comp. Pathol.*, **126**, 124–136.

- MUNGALL B.A., MIDDLETON D., CRAMERI G., BINGHAM J., HALPIN K., RUSSELL G., GREEN D., MCEACHERN J., PRITCHARD L.I., EATON B.T., WANG L.F., BOSSART K.N. & BRODER C.C. (2006). Feline model of acute nipah virus infection and protection with a soluble glycoprotein-based subunit vaccine. *J. Virol.*, **80**, 12293–12302.
- 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.
- OLSON J.G., RUPPRECHT C., ROLLIN P.E., UNG S.A., NIEZGODA M., CLEMINS T., WALSTON J. & KSIAZEK T.G. (2002). Antibodies to Nipah-like virus in bats (*Pteropus lylei*), Cambodia. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 987–988.
- ONG B.L., DANIELS P.W., BUNNING M., AZIZ J., WHITE J., MUNIANDY M., OLSON J., CHANG K.W., MORRISSY C., LIM Y.S., KSIAZEK T. & NORDIN M.N. (2000). A surveillance program for the detection of pig herds exposed to Nipah virus infections in peninsular Malaysia. *In: Proceedings of the 9th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE)*. Abstract ID 63. Colorado, USA.
- 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.
- PATON N.I., LEO Y.S., ZAKI S.R., AUCHUS A.P., LEE K.E., LING A.E., CHEW S.K., ANG B., ROLLIN P.E., UMAPATHI T., SNG I., LEE C.C., LIM E. & KSIAZEK T.G. (1999). Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore. *Lancet*, **354**, 1253–1256.
- 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.
- ROGERS R.J., DOUGLAS I.C., BALDOCK F.C., GLANVILLE R.J., SEPPANEN K.T., GLEESON L.J., SELLECK P.N. & DUNN K.J. (1996). Investigation of a second focus of equine morbillivirus infection in coastal Queensland. *Aust. Vet. J.*, **74**, 243–244.
- SENDOW I., FIELD H.E., CURRAN J., DARMINTO, MORRISSY C.J., MEEHAN G., BUICK T. & DANIELS P.W. (2006). Henipavirus in *Pteropus vampyrus* bats, Indonesia. *Emerg. Infect. Dis.*, **12**, 711–712.
- 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.
- SOHAYATI A.R., HASSAN L., EPSTEIN J.H., ZAINI C.M., AZIZI M.Y., SHARIFAH S.H., FIELD H.E., TOM H., JUSTIN W., NAIM S.N., ARSHAD S.S., AZIZ JAMALUDDIN A., DASZAK P. & HENIPAVIRUS ECOLOGY RESEARCH GROUP (2013). Risk factors for Nipah virus infections among pteropid bats, Peninsular Malaysia. *Emerg. Infect. Dis.*, **1**, 51–60.
- SOHAYATI A.R., HASSAN L., SHARIFAH S.H., LAZARUS K., ZAINI C.M., EPSTEIN J.H., SHAMSUYUL NAIM N., FIELD H.E., ARSHAD S.S., ABDUL AZIZ J., DASZAK P. & HENIPAVIRUS ECOLOGY RESEARCH GROUP (2011). Evidence of Nipah virus recrudescence and serological pattern of captive *Pteropus vampyrus*. *Epidemiol. Infect.*, **10**, 1570–1579.
- TAMIN A., HARCOURT B.H., LO M.K., ROTH J.A., WOLF M.C., LEE B., WEINGARTL H., AUDONNET J.C., BELLINI W.J. & ROTA P.A. (2009). Development of a neutralization assay for Nipah virus using pseudotype particles. *J. Virol. Methods*, **160**, 1–6.
- 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.
- WACHARAPLUESADEE S., LUMLERTDACHA B., BOONGIRD K., WANGHONGSA S., CHANHOME S., ROLLIN P., STOCKTON P., RUPPRECHT C.E., KSIAZEK T.G. & HEMACHUDHA T. (2005). Bat Nipah Virus, Thailand, *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 1949–1951.
- WILLIAMSON M.M., HOOPER P.T., SELLECK P.W., GLEESON L.J., DANIELS P.W., WESTBURY H.A. & MURRAY P.K. (1998). Transmission studies of Hendra virus (equine morbillivirus) in fruit bats, horses and cats. *Aust. Vet. J.*, **76**, 813–818.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2004). Laboratory Biosafety Manual, Third Edition. WHO, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>
- 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.

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., SINNIH 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 la página web de la OIE:

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

Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE para 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 2015.