

ENCEFALITIS JAPONESA

RESUMEN

Descripción de la enfermedad: El virus de la encefalitis japonesa (VEJ) forma parte del género *Flavivirus*, en la familia *Flaviviridae*, y causa encefalitis, principalmente en los caballos y en el ser humano. El VEJ también infecta a los cerdos, en los que causa abortos y nacidos muertos. El VEJ se mantiene en la naturaleza entre los mosquitos, los cerdos y las aves acuáticas. El principal vector del VEJ en la mayor parte de Asia es *Culex tritaeniorhynchus*, pero localmente pueden adquirir importancia otras especies. Los cerdos actúan como importantes amplificadores del virus, aunque en la amplificación y diseminación al medio también pueden intervenir aves. Se ha detectado la enfermedad en amplias zonas de Asia y en la zona del Pacífico occidental. En los caballos, suele ser una infección subclínica. Los caballos afectados presentan signos clínicos que consisten en pirexia, depresión, temblores musculares y ataxia. En los cerdos, pueden tener lugar abortos y nacidos muertos cuando las cerdas gestantes resultan infectadas por el VEJ por primera vez. Las cerdas gestantes infectadas no suelen presentar signos clínicos.

Identificación del agente: Para el aislamiento del virus se recogen muestras de encéfalo de caballos muertos o enfermos con signos clínicos de encefalitis. Algunos procedimientos del aislamiento son la inoculación de ratones y los cultivos celulares. Se inoculan por vía intracerebral ratones de 2–4 días de vida con una suspensión de tejido cerebral. Si los ratones muestran signos neurológicos seguidos de la muerte en un plazo de 14 días, entonces se podrá identificar el virus mediante cultivos celulares. También puede aislarse el virus en cultivos celulares primarios preparados a partir de células renales de embriones de pollo, porcinas o de hámster y líneas celulares establecidas, como células renales de mono verde africano (Vero), células renales de hámster neonato (BHK-21) o células de mosquito (C6/36). La identificación del virus aislado en ratones o en cultivos de tejidos se confirma mediante métodos serológicos o de detección de ácido nucleico.

Pruebas serológicas: El ensayo de detección de anticuerpos es una técnica útil para determinar la prevalencia de la infección en una población de caballos y también para el diagnóstico de la encefalitis japonesa en los individuos enfermos. Los métodos analíticos son la neutralización vírica (VN), la inhibición de la hemaglutinación (HI), la fijación del complemento (CF) y el ensayo de inmunoenzimático (ELISA). Se produce una reacción cruzada con otros flavivirus, como el virus del Nilo Occidental, lo que puede conllevar un diagnóstico equivocado. La prueba de NV mediante reducción de placas es la más específica y puede utilizarse para diferenciar la infección causada por el VEJ de otras infecciones debidas a flavivirus. Dada la neutralización cruzada con el serocomplejo de la encefalitis japonesa, los estudios serológicos deben incluir paralelamente pruebas de detección de flavivirus co-circulantes.

Requisitos para las vacunas: En varios países asiáticos se dispone de dos tipos de vacunas para humanos y animales. Para caballos, se han utilizado vacunas inactivadas preparadas a partir de encéfalos de ratón infectados o en cultivos celulares. Para cerdos, se dispone de vacunas inactivadas y de vacunas atenuadas vivas.

A. INTRODUCCIÓN

La encefalitis japonesa (EJ) es una enfermedad causada por un flavivirus transmitido por un mosquito que desencadena signos clínicos de encefalitis en humanos y caballos infectados, y puede ser mortal (Fenner *et al.*, 1992; Hoke Jr. y Gingrich, 1994). Sin embargo, las infecciones tanto de seres humanos como de caballos suelen ser subclínicas. El virus de la EJ (VEJ) también causa incapacidad reproductiva en cerdas, que conduce a

nacidos muertos, abortos o momificación fecal, aunque las cerdas gestantes infectadas no suelen presentar signos clínicos y la infección no afecta a las futuras gestaciones (Williams *et al.*, 2012).

El VEJ se mantiene en la naturaleza entre los mosquitos, las aves salvajes y los cerdos. Los cerdos actúan como importantes amplificadores del virus, aunque en la amplificación y diseminación al medio también pueden intervenir aves. El principal vector del VEJ es *Culex tritaeniorhynchus* en la mayor parte de Asia. También pueden intervenir como vectores otros mosquitos culicidos. Dados los bajos títulos y la corta duración de la viremia, ni los humanos ni los caballos transmiten el virus a mosquitos picadores y se consideran huéspedes terminales. El VEJ está extendido por los países del este, sureste y sur asiático y, recientemente, se ha propagado a la India occidental y a la región del Pacífico occidental, incluidos el archipiélago de Indonesia occidental, Nueva Guinea de Papua y el norte de Australia (Mackenzie *et al.*, 2007).

El VEJ pertenece al género *Flavivirus*, en la familia Flaviviridae. El VEJ es el miembro tipo del serocomplejo de la encefalitis japonesa, junto con varios virus zoonóticos importantes, como el virus del Nilo Occidental (véase el Capítulo 3.1.24), el virus de la encefalitis de St. Louis o el virus de la encefalitis del Valle de Murray. Solo se ha identificado un serotipo del VEJ, aunque se han observado diferencias antigénicas y genéticas entre las cepas del VEJ mediante varias técnicas, como la fijación del complemento, la inhibición de la hemaglutinación, o pruebas de neutralización utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales (Ali y Igarashi 1997; Banerjee, 1986; Hale & Lee, 1954; Hasegawa *et al.*, 1994; Kimura-Kuroda y Yasui, 1986) e identificación de oligonucleótidos del ARN vírico (Banerjee y Ranadive, 1989; Hori *et al.*, 1986). Se ha observado que el análisis del gen de la envoltura (E) es representativo del análisis filogenético del VEJ. Hasta la fecha, se han descrito cinco genotipos del VEJ en base a análisis filogenéticos del gen vírico E (Solomon *et al.*, 2003; Uchil y Sachidanandam, 2001; Williams *et al.*, 2000).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la encefalitis japonesa y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente¹						
Aislamiento del virus	–	–	–	+++	–	–
Detección de antígeno	+	+	+	+	+	–
RT-PCR en tiempo real	++	++	++	++	++	–
Detección de respuesta inmunitaria						
HI	++	+++	++	+++	+++	+++
CFT	+	+	+	+	+	+
ELISA	++	++	++	++	++	++
VN (PRNT)	+	++	+	+++	++	++
IFAT	+	+	+	+	+	+

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito; n/a = no aplicable. Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido validadas formalmente, su uso sistemático y hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hace aceptables.
RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; HI = inhibición de la hemaglutinación; CFT = fijación del complemento; ELISA = enzimoimmunoanálisis; VN = neutralización del virus; PRNT: neutralización por reducción de placas; IFAT = inmunofluorescencia indirecta.

1 Se recomienda aplicar una combinación de métodos de identificación del agente a la misma muestra clínica.

En los caballos o en casos de insuficiencia reproductiva en cerdas, el diagnóstico definitivo de la encefalitis japonesa debe basarse en el aislamiento o en la detección del virus causal en muestras neurológicas. Normalmente, la tasa de aislamiento del virus en muestras tomadas de caballos enfermos o muertos es muy baja, lo cual puede deberse a la inestabilidad del virus en ciertas condiciones medioambientales, así como a la presencia de anticuerpos en los animales infectados. Los hallazgos clínicos, serológicos y patológicos pueden servir de ayuda en el diagnóstico. También es posible el diagnóstico mediante la detección de anticuerpos específicos IgM e IgG en el líquido cefalorraquídeo utilizando métodos de enzimoimmunoanálisis (ELISA) (Burke *et al.*, 1982). Se ha detectado un ácido nucleico vírico en el encéfalo de los caballos infectados mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) (Lian *et al.*, 2002; Lam *et al.*, 2005).

En los caballos, las muestras recogidas para aislar el virus o detectarlo (ácido nucleico o antígeno) son porciones del cuerpo estriado, córtex o tálamo del cerebro. También se pueden utilizar muestras de sangre o médula espinal. En los fetos, nacidos muertos o neonatos de cerdas, el virus puede aislarse o detectarse a partir de muestras de encéfalo, bazo, hígado o placenta. Todas las muestras deben refrigerarse inmediatamente después de recogerse y se deben congelar a -80°C si se van a conservar durante más de 48 horas. Todas las manipulaciones de laboratorio que se realicen con cultivos vivos o material que pueda estar infectado o contaminado deben llevarse a cabo a un nivel de bioseguridad y contención adecuado que se determinará mediante 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*) para prevenir el riesgo de infección humana. El hombre se puede infectar por el contacto directo del material infeccioso con lesiones de la piel o las mucosas, por la inoculación parenteral accidental o por aerosoles. Las personas que intervengan en el diagnóstico y que recojan muestras deberán aplicar las precauciones adecuadas. Se dispone de una vacuna humana y deben vacunarse los trabajadores de laboratorio y los veterinarios de campo con riesgo de contagio.

1. Identificación del agente

Se homogeneizan muestras de tejido en una suspensión al 10% de solución salina tamponada y de pH 7,4 que contenga suero de ternero (2%) o seroalbúmina bovina (0,75%), estreptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y penicilina (100 unidades/ml). El suero de ternero debe estar libre de anticuerpos contra el VEJ. La suspensión se centrifuga a 1.500 **g** durante 15 minutos, y para el análisis se extrae el sobrenadante. Para el aislamiento del virus en cultivo celular se pueden utilizar cultivos primarios de embrión de pollo, riñón de mono verde africano (Vero), riñón de cría de hámster (BHK) o la línea celular de mosquito C6/36 (una línea celular clonada de *Aedes albopictus*). Se inoculan homogenados de muestras en los cultivos celulares, como encéfalo o sangre obtenidos de animales sospechosos de estar infectados. A diferencia de lo que se observa en las células de vertebrados, en las células C6/36 el VEJ no suele causar efecto citopático (ECP). Por lo tanto, para la confirmación puede ser necesario otro cultivo en células de vertebrados y/o la detección del antígeno o el ARN del virus. Para identificar el virus en monocapas celulares infectadas fijadas empleando la prueba de la inmunofluorescencia indirecta también pueden utilizarse anticuerpos monoclonales específicos de flavivirus y del VEJ (Lian *et al.*, 2002).

Para el aislamiento del virus con ratones, se administra un inóculo intracerebral de 0,02 ml a ratones de 2–4 días de edad. Dichos ratones se mantienen bajo observación clínica durante 14 días. Puede que no desarrollen unos signos claros pero la anorexia se hará evidente por la desaparición de la mancha blanca lechosa del abdomen. Posteriormente la piel cambia de color, de rosada a rojo oscuro y, de inmediato, sufren convulsiones antes de morir. Los ratones gravemente enfermos deben sacrificarse. Se recogen los encéfalos de los ratones muertos o sacrificados y se conservan a -80°C para la confirmación mediante RT-PCR o a para llevar a cabo un pase posterior en encéfalo de ratón o cultivo celular.

La detección de antígeno a partir de encéfalos de ratones infectados puede realizarse empleando antígeno extraído con sacarosa/acetona preparado como se describe en el apartado B.2.b.1. Hay que comprobar si este antígeno es capaz de aglutinar los glóbulos rojos (RBC) de pollos de 1 día de vida o de gansos a distintos valores de pH, entre pH 6,0 y 7,0, a intervalos de pH 0,2, de acuerdo con el método descrito (Clarke y Casals, 1958). De forma resumida, se preparan diluciones 1/24 de las suspensiones de RBC en el diluyente con diferentes valores de pH. En una placa de microtitulación de 96 pocillos con el fondo en U, se diluyen de forma seriada volúmenes de 25 μl del antígeno extraído. A continuación, en cada pocillo se depositan 25 μl de los RBC diluidos. Se incuba la placa a 37°C durante 1 hora, y se lee el resultado de la hemaglutinación. Si el antígeno es capaz de hemaglutinar los glóbulos rojos, se utiliza en una prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI), utilizando un antisuero contra el virus de la EJ.

Para detectar ARN del virus de la EJ a partir de muestras clínicas de células de vertebrados que presenten ECP o de encéfalos de ratones infectados, también puede emplearse una RT-PCR con cebadores adecuados específicos del VEJ (Chung *et al.*, 1996; Jan *et al.*, 2000; Lian *et al.*, 2002; Tanaka, 1993; Williams *et al.*, 2001). Recientemente se ha utilizado un nuevo método de detección del ácido nucleico, la amplificación isotérmica mediada por bucle con transcriptasa inversa (RT-LAMP) para detectar el ARN del VEJ (Parida *et al.*, 2006). Para el diagnóstico en humanos se han descrito otros métodos de RT-PCR, aunque hay pocos datos publicados sobre los métodos de detección del ácido nucleico en aplicaciones veterinarias.

2. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas son útiles para determinar la prevalencia de la infección en una población animal, la distribución geográfica del virus y el grado de producción de anticuerpos en los caballos vacunados. Para aplicar las pruebas con fines de diagnóstico de la infección o de la enfermedad en animales domésticos o fauna salvaje, debe recordarse que en una zona endémica puede haber tenido lugar una infección previa por el virus. Al analizar caballos o cerdos, también debe tenerse en cuenta el estado respecto a la vacunación a la hora de interpretar resultados serológicos positivos. En los cerdos, los anticuerpos maternos también pueden persistir hasta 8 meses. Las pruebas de detección de anticuerpos constituyen una técnica útil para determinar la prevalencia de la infección en una población de animales, y también para el diagnóstico de la EJ en caballos o cerdos enfermos. Dichas pruebas son la neutralización vírica (NV), la inhibición de la hemaglutinación (HI), la fijación del complemento (CF) y el ensayo de inmunoenzimología (ELISA). Para el diagnóstico, es preciso que se produzca un aumento importante del título de anticuerpos en los sueros pareados recogidos en las fases aguda y de convalecencia (por ejemplo, una cuadruplicación del título de VN). Asimismo, se debe considerar la especificidad de cada prueba serológica. Recientemente se ha descrito una prueba de aglutinación en látex para detectar anticuerpos porcinos de la encefalitis japonesa (Xinglin *et al.*, 2002). Puede utilizarse un ELISA para anticuerpos contra la proteína no estructural (NS1) del VEJ con el fin de diferenciar los anticuerpos creados contra una infección natural de los inducidos por vacunas inactivadas.

En algunas regiones del mundo, para poder lograr un diagnóstico inequívoco de la encefalitis japonesa es necesario llevar a cabo pruebas adicionales para detectar virus relacionados. Por ejemplo, en Australia se encuentran el virus de la encefalitis del Valle Murray y el virus Kunjin; estos virus son miembros del serocomplejo del VEJ y están antigénicamente relacionados con el VEJ. La expansión reciente de la distribución del virus de la encefalitis del Nilo Occidental en Norteamérica, donde se sabía que el virus de la encefalitis de St. Louis era endémico, ilustra aún más la flexibilidad de los flavivirus para adaptarse a nuevos ambientes. La presencia de anticuerpos contra estos otros flavivirus puede dificultar el diagnóstico serológico de la encefalitis japonesa. En todas las pruebas se produce cierta reacción cruzada con otros flavivirus; en cuanto a la prueba de la NV mediante la reducción de placas, es la más específica, sobre todo si se utiliza un umbral de neutralización del 90%.

2.1. Neutralización del virus (prueba de neutralización por reducción de placas)

2.1.1. Cultivo celular

Para propagar virus y para la prueba de la neutralización por reducción de placas (PRNT) se recomienda utilizar células Vero derivadas de mono verde africano (ATCC n° CCL-81).

Las células Vero se cultivan en un medio mínimo esencial alfa completo (α -MEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) y antibióticos. Para preparar las células para la PRNT en un formato de 24 pocillos, se aplica el siguiente protocolo:

- i) Se verifica que las células Vero estén en la fase log (unas 2×10^7 células en un frasco de 175 cm²) con una viabilidad superior al 95%.
- ii) Se añaden entre $1,0 \times 10^4$ y 5×10^4 células a cada pocillo de la placa; las células se mantienen a 37°C en una incubadora con un 5% de CO₂ durante 2 o 3 días.

Debe prepararse una monocapa celular confluyente 2–3 días antes de llevar a cabo la prueba, dado que la monocapa celular es crucial para la formación de placa y para evaluar los resultados.

2.1.2. Cepa vírica y propagación

La cepa del VEJ (cepa KV1899 o cepa Nakayama) se usa de forma habitual para la PRNT.

Las condiciones para la preparación del virus deben estandarizarse con el uso de una multiplicidad de infección (MOI) adecuada (MOI: 10^{-2} a 10^{-3}).

2.1.3. Reactivos

- i) α -MEM suplementado con FBS al 2–5% y antibióticos (100 unidades/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin). Para la PRNT, debe emplearse una concentración final baja de FBS, de entre el 2 y el 5%, para el cultivo vírico y celular y para la dilución de las muestras.

- ii) Solución primaria de agarosa al 4% (disuelta en agua destilada). Para preparar el medio de recubrimiento para la formación de placa, se suelen utilizar soluciones de agarosa a una concentración final del 1–2%.
- iii) Solución roja neutra al 0,1%. Para visualizar la placa, se añade una tinción vital, como el rojo neutro, al medio de recubrimiento. El rojo neutro es citotóxico a concentraciones altas y fotosensible, y por lo tanto se recomienda usar una concentración baja. El rojo neutro se disuelve en agua destilada a una concentración del 0,1% (p/v) y, tras esterilizarlo en autoclave, la solución se conserva en un recipiente opaco a 4°C hasta su uso.

2.1.4. Preparación del medio de recubrimiento

Composición del medio del primer recubrimiento:

Reactivos	Cantidad
α-MEM con antibióticos	14 ml
FBS (concentración final del 5%)	1 ml
Solución primaria de agarosa al 4%	5 ml
Volumen total	20 ml

Composición del medio del segundo recubrimiento:

Reactivos	Cantidad
α-MEM con antibióticos	12,8 ml
FBS (5 concentración final del 5%)	1 ml
Solución primaria de agarosa al 4%	5 ml
Solución de rojo neutro al 0,1%	1,2 ml
Volumen total	20 ml

Todas las cantidades y volúmenes se dan en un formato de placa de 24 pocillos. Los reactivos deben combinarse justo antes de ser utilizados. Debe asegurarse que el medio de recubrimiento se mantenga a 42°C antes de añadirlo a los pocillos.

2.1.5. Prueba de la placa vírica

Para lograr una medición exacta, antes de llevar a cabo la PRNT debe determinarse cuál es la dosis de virus adecuada para el desafío. Por lo tanto, el número objetivo de placas puede determinarse mediante la prueba de la placa vírica.

En el caso de los virus de la familia *Flaviviridae*, para esta prueba lo habitual es utilizar un método de dos recubrimientos.

Procedimiento analítico (formato de placa de 24 pocillos)

- i) Se preparan monocapas celulares confluentes al 90-100% en un formato de 24 pocillos.
- ii) Se prepara una dilución seriada 7-log (10^{-1} a 10^{-7}) de la reserva de VEJ clarificada en un α-MEM completo. Para ello, se realiza una dilución secuencia de 0,2 ml de la reserva vírica en 1,8 ml de medio, en un microtubo.
- iii) Tras identificar las placas, se desecha el medio de cada pocillo y de inmediato se sustituye por 0,1 ml de la dilución vírica adecuada. Como control negativo, se añade medio completo sin virus.
- iv) Se incuban las células con virus durante 1 hora a 37°C en una incubadora con CO₂.
- v) Tras esta hora de incubación, se elimina de los pocillos el medio que contenga virus y se sustituye por 0,5 ml de agarosa que contenga medio del primer recubrimiento.
- vi) Se deja que el recubrimiento de agarosa se endurezca durante 1 hora a temperatura ambiente, y las placas se incuban en incubadora con la parte superior hacia abajo para minimizar la condensación de agua en los pocillos, a 37°C durante 48 horas para que aparezcan placas víricas.

- vii) Se añaden 0,5 ml del segundo medio de recubrimiento que contenga rojo neutro al 0,1% a cada pocillo y se deja que el recubrimiento de agarosa se endurezca durante 1 hora en la incubadora opaca.
- viii) Las placas se incuban con la parte superior hacia abajo en una incubadora con CO₂ a 37°C durante 48 horas para que las células se tiñan al máximo.
- ix) Las placas se cuentan a simple vista y se calcula el título de la reserva vírica. Este título puede calcularse a partir de la siguiente fórmula:

Título (unidades formadoras de placa [UFP]/ml) = número de placas x factor de dilución x 1 ml de inóculo por pocillo.

2.1.6. PRNT de suero porcino contra el VEJ

Procedimiento analítico

- i) Se preparan monocapas celulares con 90–100% de confluencia en un formato de 24 pocillos
- ii) Se preparan diluciones seriadas a la mitad o a una cuarta parte de los sueros problema y de los sueros control positivo y negativo. Los sueros problema deben inactivarse por calor a 56°C durante 30 minutos antes de llevar a cabo la prueba. Todos los sueros problema que vayan a analizarse deben diluirse inicialmente a 1/10 mediante un α -MEM completo antes de realizar diluciones a la mitad.

Grupo problema según el tipo de suero:
 - a) Sueros porcinos de cerdos no vacunados;
 - b) Sueros porcinos obtenidos de cerdos vacunados;
 - c) Suero porcino inmunopositivo respecto al VEJ;
 - d) Suero negativo: FBS o suero porcino inmunonegativo respecto al VEJ.
- iii) Se preparan diluciones víricas de 200 UFP/0,1 ml. La dosis de placa vírica en el diluyente debe determinarse previamente mediante la prueba de la placa vírica. También deben prepararse diluciones víricas de 20 UFP/0,1 ml con fines comparativos (se emplean como valor de corte del título vírico).
- iv) Se añade un volumen equivalente de la dilución sérica a la reserva vírica diluida de tal forma que se obtenga una concentración vírica final de alrededor de 100 UFP/0,2 ml. En el caso de la dilución vírica de 20 UFP/0,1 ml, la concentración final de reserva vírica será de 10 UFP/0,2 ml.
- v) Se incuba la placa con la mezcla de suero y virus durante 1 hora a 37°C. Tras la incubación, se transfieren 0,1 ml de la mezcla a la célula.
- vi) Tras esta incubación de 1 hora, se elimina de los pocillos el medio que contiene virus y se sustituye por 0,5 ml de agarosa que contenga el medio del primer recubrimiento.
- vii) Se deja que el recubrimiento de agarosa se endurezca durante 1 hora a temperatura ambiente, y las placas se incuban en incubadora con la parte superior hacia abajo para minimizar la condensación de agua en los pocillos, a 37°C en una incubadora con CO₂ durante 48 horas para que aparezcan placas víricas.
- viii) Se añaden 0,5 ml del segundo medio de recubrimiento que contenga rojo neutro al 0,1% a cada pocillo y se deja que el recubrimiento de agarosa se endurezca durante 1 hora en la incubadora opaca
- ix) Las placas se incuban con la parte superior hacia abajo en una incubadora con CO₂ a 37°C durante 48 horas para que las células se tiñan al máximo
- x) Las placas se cuentan a simple vista y se calcula el título de la reserva vírica.
- xi) Se calcula el número medio de placas de los pocillos control sin suero y se determina el umbral de UFP para un nivel de reducción del 50% y del 90%: reducción del 50% = 0,5 x UFP/pocillo (sin suero); reducción del 90% = 0,1 x UFP/pocillo (sin suero).
- xii) Se calcula el título a punto final del 50% y del 90% para cada suero problema, estando la dilución del suero lo más cercana posible al nivel de reducción relativo al número medio de placas de los pocillos control sin suero.

2.2. Inhibición de la hemaglutinación

La prueba de HI se utiliza ampliamente para el diagnóstico de la encefalitis japonesa, pero presenta una reacción cruzada con otros flavivirus. Para esta prueba, primero deben tratarse los sueros con acetona o caolín y a continuación ser adsorbidos con RBC homotípicos para eliminar cualquier hemaglutinina inespecífica que pueda haber en los sueros analizados. Se utilizan RBC de ganso o los de pollo de 1 día de vida a pH óptimo (véase la tabla abajo). El pH óptimo depende de la cepa de VEJ que se utilice. Se debe llevar a cabo la prueba con los sueros tratados y 8 unidades del antígeno estándar; en algunos países se encuentra disponible comercialmente.

2.2.1. Hemaglutinación (HA)

- i) Preparación del antígeno vírico
 1. **Extracción del antígeno con sacarosa y acetona a partir de encéfalos de ratones lactantes infectados (SMB)**
 - a) Los SMB infectados se homogeneizan con 4 volúmenes de sacarosa al 8,5%.
 - b) Se añade el homogenado gota a gota a 20 veces su volumen de acetona fría.
 - c) Se centrifuga (a 500 **g** durante 5 minutos), y a continuación se elimina el sobrenadante.
 - d) El precipitado se resuspende con el volumen de acetona fría indicado anteriormente y se mantiene en un baño con hielo durante 1 hora.
 - e) Se centrifuga (a 500 **g** durante 5 minutos), y, a continuación, se elimina el sobrenadante.
 - f) Se agrupa el precipitado en un solo tubo con acetona fría.
 - g) Se centrifuga (a 500 **g** durante 5 minutos), y a continuación se elimina el sobrenadante.
 - h) Se extiende el precipitado en el interior del tubo y se seca al vacío durante 1–2 horas.
 - i) Se disuelve el precipitado seco en solución salina: el volumen será 0,4 veces el homogenado original.
 - j) Se centrifuga (a 8.000 **g** durante 1 hora, 4°C). El sobrenadante estará en condiciones de uso.
 2. **Sobrenadante infectado con la línea celular del clon C6/36 de *Aedes albopictus***
 - a) Tras una semana de incubación, se recoge el sobrenadante infectado de los cultivos infectados a 28°C.
 - b) Se centrifuga (a 1.000 **g** durante 15 minutos). El sobrenadante estará en condiciones de uso.
- ii) Preparación de glóbulos rojos de ganso
 1. **Soluciones**
 - a) **Ácido citrato dextrosa (ACD)**
11,26 g de citrato sódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); 4,0 g de ácido cítrico ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$); 11,0 g de dextrosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$); agua destilada hasta un volumen final de 500 ml. Se esteriliza en autoclave a 10 lb (1,7 unidades de presión) durante 10 minutos.
 - b) **Dextrosa gelatina veronal (DGV)**
0,58 g de veronal (Barbital); 0,60 g de gelatina; 0,38 g de veronal sódico (barbital sódico); 0,02 g (0,026 g) de CaCl_2 (si se trata de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); 0,12 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 8,50 g de NaCl; 10,0 g de dextrosa; agua destilada hasta un volumen final de 1.000 ml. Se esteriliza en autoclave a 10 lb (1,7 unidades de presión) durante 10 minutos (es más fácil preparar un volumen cinco veces el original).
 2. **Recogida de sangre**
1,5 ml de ACD + 8,5 ml de sangre (0,5 ml de ACD + 2,8 ml de sangre).

3. **Lavado (estéril)**
 - a) Sangre total + 2,5 volúmenes de DGV. Se centrifuga (500 **g** durante 15 minutos) y a continuación se elimina el sobrenadante.
 - b) Los RBC precipitados se resuspenden en tres volúmenes (sangre total) de DGV.
 - c) Se centrifuga (500 **g** durante 15 minutos), y a continuación se elimina el sobrenadante. Se repiten las etapas 2 y 3 dos veces más (en total cuatro ciclos de centrifugación).
 - d) Se transfiere la solución final de RBC a un frasco cubierto con papel de aluminio.
 4. **Ajuste de la concentración de los RBC.**
 - a) 0,2 ml de la suspensión de los RBC + 7,8 ml de NaCl al 0,9% (dilución 1/40).
 - b) La lectura se realiza a una densidad óptica (OD) de 490 en un espectrofotómetro con tubos de 10 mm.
 - c) Se ajusta la solución madre de los RBC de modo que la dilución 1/40 dé 0,450 a OD₄₉₀. (Volumen final = volumen inicial × absorbancia a OD₄₉₀/0,450).
 - d) La solución madre de los RBC se conserva en una nevera durante un máximo de 1 semana.
 - e) Antes de usarlos, los RBC se resuspenden cuidadosamente y se diluyen 1/24 en diluyente para ajustar el virus (VAD).
- iii) Dilución del antígeno
1. **Soluciones de base (se deben mantener a 4°C)**
 - a) NaCl 1,5 M
87,7 g de NaCl y agua destilada hasta un volumen final de 1.000 ml
 - b) Ácido bórico 0,5 M
30,92 g de H₃BO₃ y agua destilada caliente hasta un volumen final de 700 ml (se disuelve el ácido bórico y se enfría)
 - c) NaOH 1 N
40,0 g de NaOH y agua destilada hasta un volumen final de 1.000 ml
 - d) Solución salina con borato (BS), pH 9,0
80 ml de NaCl 1,5 M, 100 ml de H₃BO₃ 0,5 M, 24 ml de NaOH 1,0 N, y agua destilada hasta un volumen final de 1.000 ml
 - e) Albúmina bovina al 4%
4 g de la fracción V de albúmina bovina (Armour), 90 ml de BS, a pH 9,0, se ajusta el pH a 9,0 con NaOH 1 N, y BS, a pH 9,0, para preparar un volumen final de 1.000 ml
 2. **Diluyente del antígeno**
Albúmina bovina al 0,4%/solución salina con borato (BABS): 10 ml de albúmina bovina al 4%, pH 9,0, y 90 ml de BS, a pH 9,0.
 3. **Diluciones seriadas**
Se preparan dos diluciones seriadas a la mitad del antígeno con BABS en placas de microtitulación con fondo en forma de U.
- iv) Adición de glóbulos rojos de ganso
1. **Soluciones de base**
NaCl 1,5 M
Na₂HPO₄ 0,5 M: 70,99 g de Na₂HPO₄ (para Na₂HPO₄, 12 H₂O: 179,08 g), y agua destilada hasta un volumen final de 1.000 ml.
NaH₂PO₄ 1,0 M: 138,01 g de NaH₂PO₄·H₂O (para Na₂PO₄, 2H₂O: 156,01 g), y agua destilada hasta un volumen final de 1.000 ml.

2. **Solución de trabajo: diluyente para ajustar el virus (VAD)**

VAD (pH)	NaCl 1,5 M	Na ₂ HPO ₄ 0,5 M	NaH ₂ PO ₄ 1,0 M	
6,0	100	32	184	Añadir agua
6,2	100	62	160	destilada hasta
6,4	100	112	144	un volumen
6,6	100	160	120	final de
6,8	100	192	104	1.000 ml
7,0	100	240	80	

Los valores del VAD no son el pH de cada VAD, sino el pH una vez cada VAD se ha mezclado con un volumen igual de BABS, a pH 9,0.

3. **Procedimientos**

- a) 1 volumen de solución madre de los RBC de ganso + 23 volúmenes de VAD (dilución 1/24).
- b) Se depositan 25 µl de los RBC diluidos en cada pocillo de una placa de microtitulación que contenga el antígeno diluido (25 µl/pocillo).
- c) Se incuba a 37°C durante 30 minutos, y a continuación se lee el resultado.
 - ++ Aglutinación completa (película uniforme y delgada de RBC que sigue la curvatura del fondo del pocillo)
 - + Aglutinación parcial (un anillo asociado a una película rugosa o más delgada)
 - ± Aglutinación mínima (un sedimento sobre una película delgada o dispersa)

Aglutinación negativa (un sedimento claramente definido sin película de RBC)

La variable de valoración es la dilución última (la dilución mayor) en la cual se observa + + o +.

Título: el inverso de la dilución que constituye la variable de valoración.

2.2.2. **Inhibición de la hemaglutinación**

- i) Preparación de los sueros problema
 1. **Recogida de la sangre y separación de los sueros**
 - a) La muestra de sangre se incuba a 37°C durante 1 hora y a continuación a 4°C toda la noche. Si se debe realizar la prueba de inmediato, se puede reemplazar la incubación nocturna por una incubación de la muestra durante 2–3 horas a 37°C.
 - b) Se centrifuga (a 2.000 **g** durante 15 minutos) para separar el suero del coágulo sanguíneo.
 - c) Se inactiva por calor a 56°C durante 30 minutos.
 - d) Si no se procesa inmediatamente, se conserva a –20°C.
 2. **Tratamiento con 2-mercaptoetanol (se realiza este paso cuando sea preciso determinar los títulos de anticuerpos IgM).**
 - a) Se depositan 50 µl de los sueros en dos pequeños tubos de ensayo.
 - b) Se depositan 150 µl de 2-mercaptoetanol 0,13 M en PBS en uno de los tubos, y 15 µl de PBS en el otro tubo.
 - c) Después de una incubación a 37°C durante 1 hora, se enfrían en un baño con hielo.
 3. **Extracción con acetona**
 - a) Se añaden 2,5 ml de acetona fría al suero en un tubo de ensayo. Se tapan con tapones de cierre de goma, se mezclan bien y la extracción se lleva a cabo durante 5 minutos en un baño de hielo.
 - b) Se centrifugan en frío (a 1.500 **g** durante 5 minutos) y a continuación se elimina el sobrenadante.
 - c) Se repiten las etapas i e ii una vez más.

- d) El sedimento se extiende en el interior de los tubos y se seca al vacío a temperatura ambiente durante 1 hora.
 - e) A cada tubo se añaden 0,5 ml de BS, pH 9,0. Se aplican tapones de goma. El sedimento se disuelve toda la noche a 4°C hasta conseguir una dilución 1/10 de los sueros.
- 4. Extracción con caolín como alternativa a la extracción con acetona**
- a) Se utiliza caolín lavado con ácido (Fischer) al 25% en BS, pH 9,0.
 - b) 1 volumen de sueros + 4 volúmenes de BS + 5 volúmenes de caolín al 25 %.
 - c) Se extrae a temperatura ambiente durante 20 minutos con agitación ocasional.
 - d) Se centrifuga (1.000 **g** durante 30 minutos). El sobrenadante es una dilución de los sueros a 1/10.
- 5. Adsorción con los RBC de ganso**
- a) Para cada suero se añade un volumen 1/50 de concentrado de RBC de ganso.
 - b) Se adsorbe durante 20 minutos en un baño con hielo.
 - c) Se centrifuga (800 **g** durante 10 minutos). El sobrenadante está preparado para la prueba de HI (dilución a 1/10).
- ii) Prueba de inhibición de la hemaglutinación
- 1. Titulación primaria de hemaglutinación del antígeno**
- El antígeno se diluye hasta preparar 8 unidades/50 µl.
- 2. Dilución a la mitad seriada de los sueros problema en una placa de microtitulación**
- a) Reacción suero–antígeno
- Se depositan 25 µl del antígeno diluido en los pocillos que contengan los sueros problema diluidos. Se coloca el antígeno sobrante en los pocillos vacíos y se incuba la placa a 4°C durante toda la noche o 1 hora a 37°C.
- 3. Titulación secundaria de hemaglutinación del antígeno**
- a) Se diluye a la mitad de forma seriada el antígeno preparado (8 unidades/50 µl) en volúmenes de 25 µl.
 - b) Se añaden 25 µl de BABS a cada pocillo hasta completar 50 µl/pocillo.
- 4. Adición de los RBC de ganso**
- a) Se diluye la solución madre de los RBC (1/24) en VAD.
 - b) Se distribuyen 50 µl en cada pocillo que contenga 50 µl de la mezcla del suero con el antígeno o de titulación secundaria del antígeno.
 - c) Se incuba a 37°C durante 30 minutos y a continuación se lee el resultado.
 - d) Título del suero en la prueba de HI: corresponde al inverso de la dilución mayor de los sueros problema que muestre una inhibición completa de HA.
- 5. Interpretación de los resultados**
- Una diferencia de cuatro veces entre el título de los sueros de la fase aguda y los de la fase convaleciente se considerará un aumento o reducción significativo y diagnóstico de la infección por un virus relacionado antigénicamente con el que se ha utilizado en la prueba.

2.3. Fijación del complemento

Algunas veces se utiliza la fijación del complemento (FC) para el diagnóstico serológico. Para esta prueba el antígeno se extrae con acetona y éter a partir de los encéfalos de ratones inoculados.

2.3.1. Preparación del antígeno

- i) Se extraen y se pesan los encéfalos de los ratones muertos inoculados.
- ii) Se añaden a los encéfalos 20 volúmenes de acetona fría y seguidamente se mantienen a -20°C y se homogeneizan.
- iii) La suspensión se centrifuga a 5.000 **g** durante 5 minutos a 4°C y se elimina el sobrenadante.
- iv) Al precipitado se le añade el mismo volumen de acetona fría que el utilizado en la etapa ii indicada más arriba, y se mezcla bien.
- v) Se extrae con acetona manteniendo el precipitado a -20°C durante 20 minutos, y se repite la centrifugación descrita en la etapa iii indicada más arriba.
- vi) Se repiten las etapas iv y v.
- vii) Se repiten las etapas iv y v, pero esta vez se emplean acetona fría y éter (se mezclan en volúmenes iguales).
- viii) Se repiten las etapas iv y v dos veces utilizando éter frío.
- ix) Se elimina el sobrenadante mediante un aspirador y se extiende el sedimento sobre el tubo de centrifuga.
- x) Se secan al vacío durante 1–2 horas.
- xi) El sedimento se disuelve en solución salina fría (2 ml/g de encéfalo) y se mantiene a 4°C toda la noche.
- xii) Se centrifuga a 5.000 **g** durante 1 hora. El sobrenadante es el antígeno.

2.3.2. Procedimiento analítico

- i) Los sueros problema se inactivan mediante calor a una dilución 1/4 en tampón gelatina-veronal.
- ii) Se realizan diluciones a la mitad seriadas de los sueros en una placa de microtitulación de 96 pocillos (25 μl).
- iii) Se añaden 25 μl de 4 unidades de antígeno y se mezclan mediante vibración.
- iv) Se añaden 50 μl de 2 unidades de complemento (muestra combinada de suero de cobaya fresco).
- v) Se mezcla por vibración y se incuba a 4°C durante 18 horas.
- vi) Las placas deben permanecer 15 minutos a temperatura ambiente.
- vii) A cada pocillo se le añaden 25 μl de RBC sensibilizados de oveja.
- viii) Se mezcla por vibración y se incuba a 37°C durante 30 minutos, y a continuación se lee el resultado.
- ix) La dilución mayor de los sueros problema que no muestre hemólisis es el título de los sueros obtenido en la prueba de FC. Se considerará significativa un aumento o reducción de cuatro veces o más en el título.

2.4. Enzimoimmunoanálisis

Para detectar anticuerpos contra el VEJ en caballos y cerdos se han empleado varios formatos de ELISA. Se ha observado que un ELISA de bloqueo de epítipo en el que se utiliza un anticuerpo monoclonal específico del VEJ permite detectar IgG en cerdos (Pant *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2001) y caballos (Lam *et al.*, 2005), aunque ciertos anticuerpos contra flavivirus estrechamente relacionados todavía pueden generar reacción cruzada. Asimismo, se ha comprobado que un ELISA de captura de IgM sirve para el análisis de sueros porcinos (Pant *et al.*, 2006). También se ha descrito un ELISA indirecto para estudios de prevalencia de anticuerpos contra el VEJ en cerdos (Yang *et al.*, 2006). Estas pruebas se han utilizado para estudios de seroprevalencia y estudios de diagnóstico. Los métodos serológicos convencionales no permiten diferenciar entre anticuerpos inducidos por una infección natural y anticuerpos inducidos por la vacunación. Para detectar anticuerpos inducidos por infecciones naturales pero no los inducidos por vacunas inactivadas, se ha creado un ELISA que detecta anticuerpos contra la proteína no estructural 1 (NS1) del VEJ, que solo se inducen en caso de infección (Konishi *et al.*, 2004).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

ESTE APARTADO SE ADOPTÓ EN 2010 Y ACTUALMENTE SE ESTÁ PLANTEANDO SU REVISIÓN

En varios países asiáticos se dispone de dos tipos de vacunas para humanos y animales. En los humanos se han utilizado durante años vacunas inactivadas preparadas a partir de encéfalos de ratón infectado. En el año 2009, en Japón se autorizó una vacuna inactivada derivada de cultivo de células Vero. Se ha utilizado una vacuna viva atenuada en cultivos celulares, principalmente en China.

La vacuna de la encefalitis japonesa se prepara en los caballos mediante la inactivación por formalina de una suspensión vírica procedente de cerebros de ratón infectado o cultivos celulares. Para los cerdos, en Japón se utilizan vacunas tanto inactivadas como atenuadas vivas preparadas a partir de cultivos celulares.

Las directrices a seguir para la producción de vacunas de interés veterinario se indican en el capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices indicadas aquí y en el capítulo 1.1.8. son de carácter general y pueden complementarse con los requisitos regionales y nacionales.

1. Antecedentes

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

Se han utilizado vacunas inactivadas para proteger a los caballos de la encefalitis y de la posible muerte posterior causada por la infección por el VEJ. En los cerdos, se han utilizado tanto vacunas inactivadas como vivas atenuadas para proteger a las cerdas gestantes de parir nacidos muertos.

2. Resumen de la producción y requisitos mínimos para las vacunas convencionales

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

En Japón, la cepa Beijing-1 del VEJ se utiliza para la producción de vacunas para seres humanos. Para caballos y cerdos también se utilizan otras cepas del VEJ. Las cepas víricas de las vacunas inactivadas deben ser letales para ratones de 3 semanas de edad cuando se inoculan por vía intraperitoneal, y tienen que ser capaces de crecer en un cultivo primario de células renales porcinas o en líneas celulares sensibles. La cepa vírica de la vacuna viva atenuada tiene que ser letal para ratones de 2 días de edad cuando se inocula por vía intracerebral, pero no conlleva viremia cuando se inocula en lechones de 1 mes y no infecta a los fetos cuando se inocula a cerdas gestantes durante el primer mes de la gestación. Esta cepa tiene la capacidad de hemaglutinar eritrocitos de ganso, de pollitos de 1 día o de palomas. El virus debe poderse neutralizar mediante un antisuero estándar dirigido contra el VEJ.

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

El virus del inóculo debe estar libre de bacterias, hongos, micoplasmas o virus contaminantes. En el capítulo 1.1.9 se pueden encontrar las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

El virus crece en los encéfalos de ratones de 3–4 semanas de edad o en cultivos en monocapa. Debe comprobarse si los cultivos contienen agentes extraños (véase el capítulo 1.1.9). El virus del inóculo se administra por vía intracerebral a ratones. Se recogen los encéfalos de los ratones que presentan signos clínicos graves de encefalitis. Dichos encéfalos se homogeneizan en PBS, y después de centrifugarlos a 1.500 **g** durante 30 minutos, los sobrenadantes se procesan como la suspensión vírica.

El virus del inóculo se siembra en cultivos celulares y, posteriormente, los sobrenadantes se recogen por separado a partir de cada lote en el momento en que la replicación vírica alcance su máximo. Este sobrenadante se filtra o se centrifuga a 1.500 **g** durante 30 minutos y se procesa como la suspensión vírica.

Para la vacuna inactivada, se añade formalina (0,5%) a la suspensión para inactivar todo posible virus vivo; el producto se considerará como “suspensión vírica no diluida”. Se puede añadir adyuvante para incrementar su inmunogenicidad.

Los niveles de pases no deben exceder de tres, respecto del virus original, ni de dos, respecto del virus del inóculo. Se recomienda que tanto el virus original como el del inóculo se mantengan por debajo de -70°C , o por debajo de 5°C después de la liofilización.

2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

Los cultivos celulares primarios para la producción de vacunas deben obtenerse de animales sanos. Debe comprobarse si las células primarias y las líneas celulares presentan o están libres de bacterias, hongos, micoplasmas o virus extraños. Deben analizarse los medios de cultivo, el suero fetal bovino y los suplementos para confirmar su esterilidad.

2.2.3. Control durante el proceso

Se debe examinar la suspensión vírica para detectar con técnicas de cultivo una posible contaminación bacteriana o fúngica, y para determinar la infectividad vírica mediante la inoculación intracerebral de ratón o la siembra en cultivos celulares. Se debe re-examinar la suspensión vírica no diluida e inactivada con el fin de detectar la contaminación mediante el cultivo y la microscopía después de teñir, y, asimismo, se debe comprobar que se ha logrado la completa inactivación con formalina mediante la inoculación intracerebral en ratón.

2.3. Esterilidad

2.3.1. Pruebas en los lotes de producto final

En el capítulo 1.1.9 se pueden encontrar las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario.

Para comprobar la inactividad del producto final, se inoculan a ratones de 3 semanas por vía intracerebral 0,03 ml del producto y se observan a diario. Para asegurar una completa inactivación del virus vivo, todos los ratones analizados deben sobrevivir y no presentar encefalitis pasados 14 días de observación.

Debe comprobarse la inmunogenicidad del producto final de la vacuna inactivada y de la viva atenuada.

Vacuna inactivada: Se diluye el producto a 1/10 en PBS. Se inoculan a treinta ratones de 2–3 semanas de vida y por vía intraperitoneal 0,1 ml del producto diluido, dos veces con un intervalo de 3 días. Debe haber un grupo control equivalente no inoculado. Se inoculan a diez ratones de cada grupo por vía intraperitoneal diluciones decimales seriadas (1/10, 1/100 y 1/1000) del virus adecuado, como la cepa Nakayama, 8 días después de la primera inoculación, y se observan durante 14 días. La tasa de supervivencia debe ser superior al 40% en el grupo inmunizado y la tasa de mortalidad en el grupo control debe ser superior al 90%. El título del virus utilizado para la inoculación no debe ser inferior a 10^3LD_{50} (dosis letal 50%) por cada 0,2 ml.

2.4. Requisitos para la autorización

2.4.1. Requisitos de inocuidad

Las vacunas vivas atenuadas no conllevan viremia cuando se inoculan en lechones de 1 mes de vida y no infectan a los fetos cuando se inoculan en cerdas gestantes durante el primer mes de la gestación. En el caso de la vacuna inactivada, se inoculan a diez ratones de 3 semanas de vida por vía intracerebral 0,03 ml del producto y no debe observarse muerte pasados 14 días.

2.4.2. Requisitos de eficacia

Dado que el VEJ se mantiene entre mosquitos vectores, cerdos y aves salvajes, el control y la erradicación del mismo mediante vacunas es difícil. Se utilizan vacunas para proteger a los caballos de la encefalitis y a las cerdas gestantes de parir nacidos muertos.

2.4.3. Estabilidad

El producto final debe ser plenamente eficaz durante 12 meses si se conserva a 4°C.

3. Vacunas basadas en la biotecnología

Actualmente no se dispone de vacunas basadas en la biotecnología

BIBLIOGRAFÍA

ALI A. & IGARASHI A. (1997). Antigenic and genetic variations among Japanese encephalitis virus strains belonging to genotype 1. *Microbiol. Immunol.*, **41**, 241–252.

BANERJEE K. (1986). Certain characteristics of Japanese encephalitis virus strains by neutralization test. *Indian J. Med. Res.*, **83**, 243–250.

BANERJEE K. & RANADIVE S. N. (1989). Oligonucleotide fingerprint analysis of Japanese encephalitis virus strains of different geographical origin. *Indian J. Med. Res.*, **89**, 201–216.

BURKE D.S., HISALAK A. & USSERY M.A. (1982). Japanese encephalitis. In: Proceedings of International Seminar on Viral Diseases in SE Asia and the Western Pacific, Mackenzie J.S., ed. Academic Press, Sydney, Australia, 537–540.

CHUNG Y.J., NAM J.H., BAN S.J. & CHO H.W. (1996). Antigenic and genetic analysis of Japanese encephalitis viruses isolated from Korea. *Am. J. Trop. Me. Hyg.*, **55**, 91–97.

CLARKE D.H. & CASALS I. (1958). Techniques for haemagglutination with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **7**, 561–573.

FENNER F.J., GIBBS E.P.J., MURPHY F.A., ROTT R., STUDDERT M.J. & WHITE D.O. (1992). Flaviviridae. In: Veterinary Virology, Second Edition. Academic Press, New York, USA, 441–455.

HALE J. H. & LEE L.H. (1954). A serological investigation of six encephalitis viruses isolated in Malaya. *Br. J. Exp. Pathol.*, **35**, 426–433.

HASEGAWA H., YOSHIDA M., FUJITA S. & KOBAYASHI Y. (1994). Comparison of structural proteins among antigenically different Japanese encephalitis virus strains. *Vaccine*, **12**, 841–844.

HOKE C.H. JR & GINGRICH J.B. (1994). Japanese encephalitis. In: Handbook of Zoonoses, Second Edition, Beran G.W., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 59–69.

HORI H., MORITA K. & IGARASHI A. (1986). Oligonucleotide fingerprint analysis on Japanese encephalitis virus strains isolated in Japan and Thailand. *Acta Virol.*, **30**, 353–359.

JAN L.R., YUEH Y.Y., WU Y.C., HORNG C.B., & WANG G.R. (2000). Genetic variation of Japanese encephalitis virus in Taiwan. *Am. J. Trop. Me. Hyg.*, **62**, 446–452.

KIMURA-KURODA J. & YASUI K. (1986). Antigenic comparison of envelop protein E between Japanese encephalitis virus and some other flaviviruses using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, **67**, 2663–2672.

KONISHI E., SHODA M, AJIRO N & KONDO T. (2004). Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantifying antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein to detect subclinical infections in vaccinated horses. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5087–5093.

LAM K.H.K., ELLIS T.M., WILLIAMS D.T., LUNT R.A., DANIELS P.W., WATKINS K.L. & RIGGS C.M. (2005). Japanese encephalitis in a racing thoroughbred gelding in Hong Kong. *Vet. Rec.*, **157**, 168.

LIAN W.C., LIAU M.Y. & MAO C.L. (2002). Diagnosis and genetic analysis of Japanese encephalitis virus infected in horses. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, **49**, 361–365.

MACKENZIE J.S., WILLIAMS D.T. & SMITH D.W. (2007). Japanese encephalitis virus: the geographic distribution, incidence and spread of a virus with a propensity to emerge in new areas. In: Perspectives in medical virology: emerging viruses in human populations, Tabor E., ed. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp 201–268.

PANT G.R., LUNT R.A., ROOTES C.L. & DANIELS P.W. (2006). Serological evidence for Japanese encephalitis and West Nile viruses in domestic animals of Nepal. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **29**, 166–175.

PARIDA M. M., SANTHOSH S. R., DASH P. K., TRIPATHI N. K., SAXENA P., AMBUJ K. SAHNI A. K., LAKSHMANA RAO P. V. & MORITA K. (2006). Development and evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of Japanese encephalitis virus. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 4172–4178.

SOLOMON T., NI H., BEASLEY D.W.C., EKKELENKAMP M., CARDOSA M.J. & Barrett A.D.T. (2003). Origin and evolution of Japanese encephalitis virus in Southeast Asia. *J. Virol.*, **77**, 3091–3098.

TANAKA M. (1993). Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **41**, 311–322.

UCHIL P.D. & SATCHIDANANDAM V. (2001). Phylogenetic analysis of Japanese encephalitis virus: envelope gene based analysis reveals a fifth genotype, geographic clustering, and multiple introductions of the virus into the Indian subcontinent. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **65**, 242–251.

WILLIAMS D.T., WANG L.F. DANIELS P.D. & MACKENZIE J.S. (2000). Molecular characterization of the first Australian isolate of Japanese encephalitis virus, the FU strain. *J. Gen. Virol.*, **65**, 2471–2480.

WILLIAMS D.T., DANIELS P.W., LUNT R.A., WANG L.F., NEWBERRY K.M. & MACKENZIE J.S. (2001). Experimental infections of pigs with Japanese encephalitis virus and closely related Australian flaviviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **65** (4), 379–387.

WILLIAMS D.T., MACKENZIE J.S. & DANIELS P.W. (2012). Flaviviruses. *In: Diseases of Swine*, 10th Edition, Zimmerman J.J., Karriker L., Ramirez A., Schwartz K & Stevenson G., eds. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA pp 528–537.

XINGLIN J., HUANCHUN C., QIGAI H., XIANG W., BIN W., DEXIN Q. & LIURONG F. (2002) The development and application of the latex agglutination test to detect serum antibodies against Japanese encephalitis virus. *Vet. Res. Commun.*, **26**, 495–503.

YANG D.K., KIM B.H., LIM S.I., KWON J.H., LEE K.W., CHOI C.U. & KWEON C. (2006). Development and evaluation of indirect ELISA for the detection of antibodies against Japanese encephalitis in swine. *J. Vet. Sci.*, **7**, 271–275.

*

* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la encefalitis japonesa (puede consultarse en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>). Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la encefalitis japonesa.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2016.