

CAPÍTULO 3.1.25.

FIEBRE DEL NILO OCCIDENTAL

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: La fiebre del Nilo Occidental es una enfermedad vírica que se transmite por mosquitos y que pueda afectar a las aves, al ser humano y a los caballos, causando una infección subclínica, enfermedad febril leve, meningitis, encefalitis o la muerte. El virus de la fiebre del Nilo occidental (VNO) es un miembro del género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. El arbovirus se mantiene en la naturaleza a través de las aves y los mosquitos; numerosas especies de aves y de mosquitos permiten la replicación del virus. En muchas especies de aves, la infección por el VNO no produce síntomas evidentes, mientras que en otras, como el cuervo americano (*Corvus brachyrhynchos*) y el arrendajo azul (*Cyanocitta cristata*), la enfermedad a menudo es generalizada y mortal. Entre los mamíferos, la enfermedad clínica se presenta sobre todo en los caballos y los humanos.

Los síntomas clínicos de la infección por VNO en los caballos derivan de la encefalitis inducida por virus o encefalomielititis. Las infecciones dependen de la transmisión por los mosquitos y son estacionales en climas templados, alcanzando el máximo a comienzos de otoño en el Hemisferio norte. Los caballos afectados presentan frecuentemente una ataxia de intensidad leve a grave. Los síntomas pueden variar desde una ligera descoordinación hasta la postración. Algunos caballos muestran debilidad, fasciculación muscular y problemas en los nervios craneales. La fiebre no es una característica normalmente presente en la enfermedad de los caballos.

Identificación del agente: Generalmente los tejidos de las aves contienen concentraciones más altas del virus que los de los caballos. El encéfalo y la médula espinal son los tejidos preferidos para el aislamiento del virus en los caballos. En las aves, el riñón, el corazón, el encéfalo o el intestino pueden proporcionar aislamientos del virus. El virus también puede aislarse a partir de mosquitos. Los cultivos celulares se usan frecuentemente para el aislamiento del virus. El VNO es citopático en sistemas de cultivo celulares de mamíferos susceptibles. Se pueden detectar el ácido nucleico vírico y los antígenos víricos en los tejidos de animales infectados mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) o por inmunohistoquímica, respectivamente.

Pruebas serológicas: Los anticuerpos se pueden identificar en el suero equino mediante el enzoinmunoanálisis con IgM de captura (ELISA con IgM de captura), inhibición de la hemaglutinación (IH), ELISA con IgG, neutralización por reducción de placas (NRP) o neutralización del virus (NV). Los métodos ELISA y NRP son los que se utilizan con mayor frecuencia para identificar los anticuerpos contra el VNO en suero de las aves. En algunas pruebas serológicas, se pueden encontrar reacciones cruzadas del anticuerpo con flavovirus relacionados, tales como el virus de la encefalitis de St. Louis, el virus Usutu, el virus de la encefalitis japonesa o el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (ETG).

Requisitos para las vacunas: Están disponibles una vacuna de VNO inactivada con formalina derivada de cultivos de tejidos, una vacuna de VNO con vectores de canarypoxvirus vivos, una vacuna de ADN del VNO y una vacuna quimérica para uso en caballos.

A. INTRODUCCIÓN

El virus de la fiebre del Nilo Occidental (VNO) es un arbovirus zoonótico transmitido por mosquitos que pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* (Smithburn et al., 1940). El género *Flavivirus* incluye el virus de la encefalitis japonesa (véase el capítulo 3.1.10 *Encefalitis japonesa*), el virus de la encefalitis de St. Louis, el virus de la encefalitis del valle de Murray, el virus Usutu y el virus Kunjin, entre otros (Burke & Monath, 2001). El VNO tiene

un ámbito geográfico amplio que incluye partes de Europa, Asia, África, Australia (virus Kunjin) y América del norte, central y del sur. Se cree que las aves migratorias son las responsables de la dispersión del virus, incluida la reintroducción del VNO desde las áreas endémicas a las regiones que experimentan brotes esporádicos (Burke & Monath, 2001). El VNO se mantiene por un ciclo de transmisión entre mosquito-pájaro-mosquito, mientras que los humanos y los caballos se consideran hospedadores finales. El análisis genético de las cepas de VNO permite clasificar las cepas en múltiples estirpes (Mackenzie & Williams, 2009; Vázquez et al., 2010). Las cepas de la estirpe 1 se encuentran en África central y del norte, Oriente Medio, Europa, el subcontinente indio, Australia (virus de Kunjin) y América del norte y central, Colombia y Argentina (Morales et al., 2006). Las cepas de la estirpe 2 son endémicas en África central y del Sur y en Madagascar, con co-circulación de las estirpes de ambos virus en África Central (Berthet et al., 1997; Burt et al., 2002). La circulación de las cepas de VNO del linaje 2 ha sido reportada en Austria (Wodak et al., 2011), Grecia (Danis et al., 2011), Hungría (Bakonyi et al., 2006), Italia (Savini et al., 2012), Rumania (Sirbu et al., 2011) y Rusia (Platonov et al., 2011). Cepas de virus del linaje 1 o del linaje 2 podrían estar implicadas en enfermedades humanas o animales.

El VNO se ha reconocido como un agente patógeno humano en África durante la primera mitad del siglo XX. Aunque se han descrito varias epidemias de fiebre por el VNO, antes de 1996, era rara la encefalitis como consecuencia de la infección humana por el VNO; desde entonces, los brotes de encefalitis del Nilo Occidental se han descrito en los humanos en Rumania, Rusia, Israel, Norteamérica, Francia, Túnez, Italia y Grecia. Durante los años 1960, la encefalitis del Nilo Occidental en los caballos se describió en Egipto y Francia (Panthier et al., 1966; Schmidt & El Mansoury, 1963). Desde 1998, se han descrito brotes de encefalitis equina por el VNO en Argentina, Italia, Francia, Canadá, EE.UU., España, Israel y Marruecos. En 2011, se describió en Australia un brote de encefalitis equina debida al virus Kunjin, un subtipo de VNO de linaje 1 (Frost et al., 2012; Hall et al., 2001). No hubo indicios de enfermedad causada por este virus en seres humanos ni aves.

La aparición de la enfermedad en el ser humano y en los animales junto con la vigilancia de la actividad del VNO en aves y en mosquitos ponen de manifiesto que el ámbito de distribución del virus ha aumentado drásticamente, y que incluye América del Norte, Central y del Sur así como Europa y países de la cuenca del Mediterráneo.

El periodo de incubación de la encefalitis equina por el VNO después de la transmisión por el mosquito se estima que es de 3–15 días. Una viremia de baja titulación puede preceder la aparición de los signos clínicos (Bunning et al., 2002; Schmidt & El Mansoury, 1963). La encefalitis por el VNO tiene lugar en un porcentaje pequeño de caballos infectados; la mayor parte de los infectados no presenta signos clínicos (Ostlund et al., 2000). La enfermedad en los caballos se caracteriza frecuentemente por ataxia de intensidad leve a grave. Además, los caballos pueden mostrar debilidad, fasciculación muscular y problemas en los nervios craneales (Cantile et al., 2000; Ostlund et al., 2000; 2001; Snook et al., 2001). La fiebre no siempre está presente. El tratamiento es de mantenimiento y los síntomas pueden solucionarse o progresar hasta la postración terminal. La tasa de mortalidad es de aproximadamente uno de cada tres caballos no vacunados afectados clínicamente. El diagnóstico diferencial en los caballos incluye otras encefalitis arbovíricas (por ejemplo, la encefalomielitis equina venezolana, la del este, la del oeste y la encefalitis japonesa), la mielitis equina por protozoos (*Sarcocystis neurona*), el herpesvirus-1 equino, la enfermedad de Borna y la rabia.

La mayoría de las especies de aves, puede resultar infectadas por el VNO, y la evolución clínica de la infección es variable. Algunas especies parecen ser resistentes, mientras que otras sufren una enfermedad neurológica mortal. La enfermedad neurológica mortal se han documentado en gansos domésticos en Israel y Canadá, y en muchas aves de zoológico nativas y exóticas en EE.UU. durante el surgimiento del VNO (Austin et al., 2004; Steele et al., 2000). En Europa, la enfermedad neurológica mortal se ha descrito en aves salvajes (Zeller & Schuffenecker, 2004). El VNO se ha detectado como enfermedad esporádica en un número pequeño de otras especies, incluyendo las ardillas, las ardillas listadas, los murciélagos, los perros, los gatos, los renos, las ovejas, las alpacas, los caimanes y las focas, coincidiendo la enfermedad con periodos intensos de actividad vírica. El VNO se aisló de un camello dromedario, lo cual indica que esta especie es una posible fuente de infección vírica (Joseph et al., 2016).

Se ha confirmado la transmisión del VNO en humanos por transfusión de sangre, trasplante de órganos y lactancia, pero la mayoría de las infecciones en los humanos se producen por el contagio natural debido a la picadura de los mosquitos. También se han descrito infecciones contraídas en el laboratorio (Campbell et al., 2002).

Las manipulaciones de laboratorio deben llevarse a cabo mediante procedimientos de bioseguridad y contención (BSL) que vendrán determinados por el 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). Actualmente, no se dispone de vacunas para uso humano, pero sí se está utilizando una vacuna contra el VNO en ensayos clínicos con personas. (NIH, 2015).

Debido a la presencia de infecciones latentes por el VNO, los criterios de diagnóstico deben incluir una combinación de evaluación clínica y pruebas de laboratorio.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la fiebre del Nilo Occidental 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	Demostrar ausencia de infección en la población	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente^(a)						
RT-PCR anidada ^(b)	-	++	-	+++ ^(c)	-	-
RT-PCR en tiempo real ^(b)	-	++	-	+++ ^(c)	-	-
Inmuno-histoquímica	-	-	-	+	-	-
Aislamiento en cultivo celular	-	++	-	++	-	-
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA de captura de IgM	-	-	-	++	-	-
ELISA ^(b) indirecto de IgG y de competición	++	-	+	-	++	++
NRP	++	-	+	+	++	++
VN	++	-	+	+	++	++

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; - = no adecuado para este propósito.

RT-PCR = Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; IgM = Inmunoglobulina M; ELISA = enzimoimmunoanálisis; NRP = neutralización por reducción en placa; VN = neutralización vírica.

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

^(b) La RT-PCR puede utilizarse para declarar ausencia de infección en aves domésticas. Las restricciones de movimientos no incluyen los hospedadores finales, como los caballos.

^(c) Los resultados positivos en la RT-PCR de los caballos son muy infrecuentes, por lo tanto, para confirmar casos sospechosos se recomiendan pruebas serológicas, como el ELISA de captura de IgM y la seroconversión evaluada mediante una NRP o una VN.

^(d) Ambos ELISA carecen de especificidad porque presentan reacción cruzada con anticuerpos contra otros flavivirus, por lo tanto, las muestras positivas deben confirmarse con una prueba más específica, como la NRP o la VN.

1. Identificación del agente

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

Los intentos de detección del virus en caballos vivos con signos clínicos no suelen funcionar debido a que la viremia dura muy poco tiempo. Las muestras para el aislamiento del virus incluyen el encéfalo (en concreto el romboencéfalo y el bulbo raquídeo) y la médula espinal de caballos encefalíticos que hayan muerto (Ostlund *et al.*, 2000; 2001); varios tejidos de las aves, como el corazón, el encéfalo o el hígado pueden usarse con garantía de éxito (Steele *et al.*, 2000). El VNO también puede aislarse de mosquitos. En general, las cepas víricas se obtienen con mayor facilidad a partir de ejemplares de aves y en menor medida de mosquitos y caballos.

Los virus pueden propagarse en cultivos celulares susceptibles, tales como riñón de conejo (RK-13) y células de riñón de mono verde africano (Vero), células de riñón de hámster neonato (BHK-21) o células de riñón de cerdo. El aislamiento primario en huevos de pollo embrionados o líneas celulares de *Aedes albopictus* (C6/36) seguido de pases por células de mamífero también es una opción. Puede necesitarse más de un pase en cultivos celulares para observar el efecto citopático (EC). La confirmación del aislamiento de cepas de VNO se logra mediante tinción indirecta con anticuerpos fluorescentes de cultivos infectados o mediante métodos de detección del ácido nucleico (véase más adelante).

1.2. Métodos moleculares – detección del ácido nucleico

Se han descrito varios métodos de PCR para la identificación del VNO y algunas se comercializan en forma de kit. Aquí se incluye una RT-PCR en tiempo real que permite detectar VNO tanto de estirpe 1 como de estirpe 2 (Eiden *et al.*, 2010). Además, se describe una RT-PCR convencional basada en gel y diseñada para detectar cepas de la estirpe 1 de América del Norte (Johnson *et al.*, 2001). Ambas pruebas se han utilizado con éxito con muestras obtenidas sobre el terreno. Lineage 1 WNV de Francia, Egipto, Israel, Italia, Kenia, México y Rusia demuestran una secuencia de nucleótidos altamente conservada en la región objetivo, independientemente de las especies de origen (Lanciotti *et al.*, 2000). Aunque los procedimientos de laboratorio para evitar la contaminación en un método anidado son exigentes, existe mayor sensibilidad para la detección de ARN de cepas del VNO de América del Norte con el procedimiento anidado convencional, en concreto con muestras de caballos obtenidas sobre el terreno. La eficiencia de la RT-PCR convencional para detectar otras estirpes de VNO no se conoce. En vistas de la evolución continua y el posible surgimiento de nuevas cepas del VNO, es importante realizar un seguimiento continuo de las nuevas PCR, y que se actualicen siempre que sea necesario. Las muestras adecuadas para la RT-PCR para la detección del VNO son el encéfalo en el caso de los mamíferos, y el encéfalo, el riñón, el corazón, el hígado, el bazo, el intestino y una muestra combinada de insectos en el caso de las aves. En cualquier PCR es crucial incluir controles positivos y negativos. En el caso de la RT-PCR anidada, deben aplicarse medidas para evitar la contaminación cruzada por productos de la RT-PCR primaria durante la transferencia del producto del cebador externo a los tubos de la reacción PCR anidada. Para que una PCR sea válida, los resultados de las reacciones control deben situarse dentro del intervalo esperable.

1.2.1. Extracción del ARN vírico

Existen varios kits comerciales de extracción de ARN. Debe escogerse un kit adecuado al tipo de muestra y seguir las recomendaciones del fabricante.

1.2.2. PCR en tiempo real con transcripción inversa

Eiden *et al.* (2010) desarrollaron el siguiente método para la identificación simultánea de VNO de estirpe 1 y de estirpe 2. La identificación de la cepa puede lograrse secuenciando el amplicón resultante y con la alineación con cepas de VNO de referencia. El procedimiento se ha modificado ligeramente respecto del método publicado y aquí se incluyen los cebadores y la sonda dirigida a la región NS2A del genoma del VNO. La prueba puede realizarse con un kit comercial de elección que facilite la amplificación esperada de los controles. Los parámetros de ciclado deben ajustarse para adaptarse a los requisitos del kit y a las temperaturas de derretido de los cebadores y la sonda. Para lograr unos resultados óptimos, tal vez tengan que ajustarse las concentraciones de cebador y de sonda. Tal vez se incluya un control interno y cebadores y sonda control apropiados para confirmar unas condiciones válidas de la prueba.

Cebadores/sonda (región NS2A del genoma):

Cebador directo: GGG-CCT-TCT-GGT-CGT-GTT-C

Cebador inverso: GAT-CTT-GGC-YGT-CCA-CCT-C

Sonda: FAM-CCA-CCC-AGG-AGG-TCC-TTC-GCA-A-BHQ

Se preparan volúmenes de 20 µl de los reactivos de la RT-PCR (instrucciones del kit) por cada muestra, que contengan una concentración 0,9 µM de cada cebador y una concentración 0,25 µM de la sonda. Se transfieren 20 µl de la mezcla a cada tubo o pocillo de muestra para PCR. Se añaden 0,5 µl de la muestra de ARN extraída, se sella el tubo/placa y se coloca en el termociclador. Se analizan las muestras en las condiciones que se describan para el kit, empezando con una incubación para la transcripción inversa, seguida de 45 ciclos de amplificación. Valores de Ct de 37 o inferiores se consideran positivos para el VNO. Valores de Ct de 37,1 a 42 se consideran sospechosos, e implican repetir la prueba. Valores superiores a 42 son negativos. Para que la PCR sea válida, los valores Ct de los controles positivos deben situarse en el intervalo esperable. Los controles negativos deben dar un resultado negativo.

1.2.3. PCR convencional con transcripción inversa

El siguiente método se desarrollo para la detección de VNO de estirpe 1 (Johnson *et al.*, 2001). El procedimiento se puede llevar a cabo en forma de RT-PCR de un solo paso empleando solo los cebadores externos, o como prueba anidada. La prueba anidada es la RT-PCR más sensible y se recomienda para analizar tejido encefálico de mamífero u otras muestras que puedan contener concentraciones bajas del virus. La diana de esta RT-PCR es la región E del genoma del VNO. La prueba puede llevarse a cabo con un kit comercial de elección que facilite la amplificación esperable de los controles. Los parámetros de ciclado deben ajustarse para adaptarse a los requisitos del kit.

Cebadores externos:

1401F: ACC-AAC-TAC-TGT-GGA-GTC

1845R: TTC-CAT-CTT-CAC-TCT-ACA-CT

Cebadores anidados:

1485F: GCC-TTC-ATA-CAC-ACT-AAA-G

1732R: CCA-ATG-CTA-TCA-CAG-ACT

Se preparan volúmenes de 45 µl de los reactivos de la RT-PCR que contengan una concentración 0,6 µM de cada cebador externo. Se transfieren 45 µl de la mezcla a cada tubo de PCR para muestra. Se añaden 5,0 µl de la muestra de ARN extraída y se colocan los tubos en el termociclador. Se analizan las muestras en las condiciones que se describan para el kit, empezando con una incubación para la transcripción inversa, durante 60 minutos o lo que establezca kit, a la temperatura especificada por el fabricante para la enzima proporcionada, seguida de una desnaturalización de la muestra y de 35 ciclos de amplificación. En el caso de la reacción anidada, se prepara una mezcla de reacción similar (sin transcriptasa inversa) de 49 µl por muestra que contenga los cebadores anidados y se transfiere a tubos de PCR. Se transfiere 1,0 µl del producto de la amplificación con el cebador externo al tubo de reacción anidada y se coloca en el termociclador. Debe procederse con cautela al transferir el producto de la amplificación para evitar una contaminación cruzada de las muestras. Se llevan a cabo 35 ciclos de amplificación según las recomendaciones del kit. Teniendo en cuenta las temperaturas de derretido de los cebadores, la temperatura de hibridación para la RT-PCR primaria y la PCR anidada debe ser de 46°C. Tras la amplificación, se mezclan 8–10 µl de cada producto de la PCR con un tampón de carga que contenga una tinción para ADN. Se carga la mezcla en un gel y se analiza mediante electroforesis en gel de agar y visualización bajo luz ultravioleta. Las muestras que den positivo para el VNO se identificarán mediante una banda de 445 pares de bases (solo amplificación con cebador externo) y/o una banda de 248 pares de bases (amplificación anidada). Para que la PCR sea válida, los controles positivos deben tener las bandas del tamaño esperado, y los controles negativos no deben tener bandas. Los amplicones de la PCR pueden secuenciarse para confirmar la identidad.

1.3. Detección del antígeno – técnicas de inmunomarcaje

La tinción mediante inmunohistoquímica (IHC) de tejidos de aves fijados en formalina es un método fiable de identificación de infección por el VNO en las aves. El encéfalo, el corazón, el bazo, el hígado, el intestino y el pulmón suelen dar positivo en la IHC cuando las aves están infectadas. El porcentaje de éxito de la detección mediante IHC en aves positivas mejora con el examen de múltiples tejidos. La especificidad de la identificación (por ejemplo, solo de flavivirus o solo de VNO) depende de la elección del anticuerpo detector. Los tejidos de encéfalo y médula espinal de caballos con encefalitis vírica causada por VNO no siempre son positivos en la IHC; muchos casos de encefalitis equina dan falsos negativos.

El no identificar el antígeno del VNO en el sistema nervioso central equino no descarta la infección. Consúltense los Laboratorios de Referencia de la OIE para más información.

2. Pruebas serológicas

Se pueden identificar los anticuerpos en el suero equino mediante el enzoinmunoanálisis de captura con IgM (ELISA de captura con IgM), inhibición de la hemoaglutinación (IH), ELISA con IgG, neutralización por reducción de placas (NRP) y neutralización vírica por microtítulo (NV) (Beaty et al., 1989; Hayes, 1989). El ELISA de captura con IgM descrito a continuación es particularmente útil para detectar los anticuerpos equinos resultantes de la exposición natural a VNO. Generalmente, los anticuerpos IgM específicos de VNO equino son detectables desde los 7–10 días hasta 1–2 meses después de la infección. La mayoría de los caballos con encefalitis causada por el VNO dan positivo a la prueba de ELISA de captura con IgM en el momento en que se observan los primeros signos clínicos. Los anticuerpos neutralizantes de VNO son detectables en el suero equino 2 semanas después de la infección y pueden persistir durante más de 1 año. El ELISA, la IH, la NV y la NRP suelen ser los métodos más utilizados para la identificación de los anticuerpos de VNO en suero de aves. En algunas pruebas serológicas, se pueden encontrar reacciones cruzadas entre los anticuerpos con flavivirus relacionados, como el virus de la encefalitis de St. Louis o el virus de la encefalitis japonesa. La prueba de NRP es la más específica de las pruebas serológicas de VNO; cuando sea necesario, se pueden determinar en paralelo títulos séricos de anticuerpos contra flavivirus relacionados. Finalmente, a la hora de interpretar los resultados serológicos se debe tener en cuenta el historial de vacunación contra el VNO, particularmente en las pruebas de NRP y ELISA con IgG. Puede utilizarse un ELISA de captura con IgM en especies de aves u otras especies siempre que se disponga de anticuerpos de captura específicos de la especie (por ejemplo, anti IgM de pollo). La prueba de NRP se aplica a cualquier especie, incluidas las aves.

2.1. ELISA y métodos relacionados

2.1.1. ELISA de captura con IgM equina

Se venden distintos kits de detección de IgM a partir de muestras equinas, y como alternativa se pueden preparar antígenos de VNO y controles negativos para el ELISA de captura con IgM a partir de encéfalo de ratón (véase el capítulo 3.5.5 *Encefalomiелitis equina [del Este y del Oeste]*), cultivos de tejido, o líneas celulares recombinantes (Davis et al., 2001). En Norteamérica hay marcas comerciales de reactivos para la determinación de VNO. Se puede obtener un suero control equino caracterizado, aunque no sea un estándar internacional, de los Laboratorios de los Servicios Veterinarios Nacionales, Ames, Iowa, EE.UU. Se deben preparar antígenos del virus y antígenos control en paralelo para su uso en el ELISA. Las preparaciones del antígeno deben titularse con sueros control para optimizar la sensibilidad y especificidad de la prueba. Las muestras de suero equino se analizan a una dilución de 1/400, y las muestras de líquido cefalorraquídeo equino se analizan a una dilución de 1/2 en la prueba, o según especifique el fabricante del kit. Para asegurar la especificidad, se comprueba la reactividad de cada muestra de suero se tanto con el antígeno del virus como con el antígeno control.

2.1.2. Ejemplo de procedimiento analítico

- i) Se revisten placas ELISA de 96 pocillos con fondo liso con 100 µl por pocillo de anticuerpo anti IgM equina diluido en tampón carbonato 0,5 M, pH 9,6, de acuerdo con la dilución sugerida por el fabricante para ser utilizado como anticuerpo de captura.
- ii) Se incuban las placas durante la noche a 4°C en una cámara húmeda. Las placas revestidas se pueden almacenar durante varias semanas en una cámara seca o desecada.

- iii) Antes de usarlas, se lavan las placas dos veces con 200-300 µl/pocillo de solución salina tamponada con fosfato 0,01 M, pH 7,2, que contenga Tween 20 al 0,05% (PBST).
- iv) Se bloquean las placas añadiendo 300 µl/pocillo de leche en polvo desnatada al 5% recién preparada en PBST (o según especifique el fabricante del kit) y se incuban durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se retira la solución de bloqueo y se lavan las placas tres veces con PBST.
- v) Se diluyen los sueros problema y control a 1/400 (el líquido cefalorraquídeo se diluye a 1/2) en PBST y se añaden 50 µl/pocillo de cada muestra a pocillos duplicados (total de cuatro pocillos por muestra) sobre la placa. Se incluyen los sueros control positivo y negativo preparados de la misma forma que las muestras.
- vi) Se cubren las placas y se incuban 75 minutos a 37°C en una cámara húmeda.
- vii) Se retira el suero y se lavan las placas tres veces en PBST.
- viii) Se diluye el virus y los antígenos control negativos en PBST y se añaden 50 µl de antígeno vírico a un conjunto de pocillos de sueros problema y sueros control, y se añaden 50 µl de antígeno normal al segundo conjunto de pocillos de sueros problema y control.
- ix) Se cubren las placas y se incuban durante la noche a 4°C en una cámara húmeda.
- x) Se retiran los antígenos de los pocillos y se lavan las placas tres veces en PBST.
- xi) Los anticuerpos monoclonales anti-*Flavivirus* conjugados con peroxidasa de rábano¹ se diluyen en PBST de acuerdo con las indicaciones del fabricante y se añaden 50 µl por pocillo.
- xii) Se cubren las placas y se incuban a 37°C durante 60 minutos.
- xiii) Se retira el conjugado y se lavan las placas seis veces en PBST.
- xiv) Se añaden 50 µl/pocillo de cromógeno ABTS recién preparado (ácido 2,2'-azino-di-[3-etil-benzotiazolina]-6-sulfónico) con peróxido de hidrógeno (0,1%) y se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se pueden utilizar otros cromógenos, según indique el fabricante del kit.
- xv) Se mide la absorbancia a 405 nm. Una muestra problema se considera positiva si su absorbancia en los pocillos que contienen el antígeno del virus es al menos dos veces la absorbancia del suero control negativo en los pocillos que contienen el antígeno del virus y al menos dos veces la absorbancia de la muestra analizada en paralelo en los pocillos que contienen el antígeno control.

2.1.3. ELISA indirecto y de competición

Se han desarrollado muchos ELISA indirectos y de competición comerciales e internos y se utilizan para detectar anticuerpos contra el VNO. Aunque los de competición son aplicables a sueros de todas las especies, las pruebas indirectas requieren anticuerpos secundarios específicos de especie marcados con enzimas. La mayoría de ELISA carecen de especificidad, porque reaccionan de forma cruzada con anticuerpos dirigidos a otros flavivirus, en concreto los del serogrupo de la encefalitis japonesa. Son muy útiles para fines epidemiológicos y de vigilancia, así como método de detección sistemática. Un resultado positivo en un ELISA, no obstante, deberá confirmarse mediante una prueba más específica, como la NV o la NRP. Algunos ELISA indirectos o de competición pueden detectar anticuerpos de cualquier tipo de inmunoglobulina (IgM, IgG, etc.). Los caballos vacunados a menudo dan positivo en los ELISA indirecto o de competición.

¹ Disponible en centros de Prevención y Control de la Enfermedad, Reactivos de Referencia Biológica, 1600 Clifton Road NE, Mail Stop C21, Atlanta, Georgia, 30000, EE.UU.

2.2. Neutralización

2.2.1. Neutralización por reducción de placas (aplicable a suero de cualquier especie)

La prueba de NRP se lleva a cabo en cultivos celulares Vero en recipientes de 25 cm² o en placas de 6 pocillos. Los sueros se pueden analizar a una dilución final de 1/10 y 1/100 o se pueden valorar para establecer un punto final. A continuación se ofrece una descripción de la prueba llevada a cabo en matraces de 25 cm² utilizando 100 unidades formadoras de placas o placas (UFP) del virus.

Previamente a la prueba, el suero se inactiva por calor a 56^o C durante 30 minutos y se diluye en medios de cultivo celular (por ejemplo 1/5 y 1/50). Se prepara una dilución de virus (200 UFP por 0,1 ml) en medios que contengan 10% de complemento de cobaya. Se mezclan volúmenes iguales de virus y de suero y se incuban a 37°C durante 75 minutos antes de inocular 0,1 ml en monocapas de cultivos celulares confluentes. El inóculo se absorbe durante 1 hora a 37°C, y después se añaden 4,0 ml de medio primario de cobertura. Este medio primario está formado por dos soluciones que se preparan separadamente. La solución I contiene Solución Salina Básica de Earle 2 × sin rojo fenol, suero bovino fetal al 4%, gentamicina a 100 µl/ml y bicarbonato sódico al 0,45%. La solución II está formada por agar noble al 2%, que se esteriliza y mantiene a 47 C. Se ajustan a 47°C volúmenes iguales de las soluciones I y II y se mezclan inmediatamente antes de su uso. La prueba se incuba durante 72 horas a 37°C. Se aplica a cada recipiente 4,0 ml de un segundo medio de cobertura, preparado como se indicó anteriormente, pero conteniendo también rojo neutro al 0,003%. Después de otra incubación durante la noche a 37°C, se evalúa el número de placas ocasionadas por el virus en cada matraz. Los títulos de punto final se basan en la reducción al 90% en comparación con recipientes con virus control, que deberían tener alrededor de 100 placas.

2.2.2. Neutralización del virus – formato de microtitulación

La NV con microtitulación es una prueba que permite identificar y cuantificar anticuerpos contra el VNO presente en las muestras problema. Su rendimiento es comparable al de la NRP (Di Gennaro *et al.*, 2014); no obstante, requiere menos volumen de muestra que la NRP y es más adecuada cuando solo se dispone de pequeños volúmenes de muestra (Weingartl *et al.*, 2003). Es necesario aplicar precauciones para impedir la exposición del ser humano cuando se utiliza VNO vivo en placas de microtitulación no selladas.

2.2.3. Procedimiento analítico

La línea celular más utilizada es la de células de riñón de mono verde africano (Vero). La prueba de la NV tarda en total 3–5 días.

- i) Se añaden a cada pocillo problema de una placa de microtitulación estéril de fondo plano 25 µl de cada una de las diluciones del suero problema, y se mezclan con un volumen igual que contenga 100 DICT₅₀ de VNO de referencia. Se incuban a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ en una cámara humidificada.
- ii) Pasada 1 hora de incubación, se añaden alrededor de 10⁴ células Vero por pocillo en un volumen de 50 µl de Medio Mínimo Esencial que contenga antibióticos y, tras una incubación de 3–5 días, la prueba se lee empleando un microscopio invertido.
- iii) A cada pocillo se le asigna una puntuación de grado de ECP observado. Una muestra se considera positiva cuando presenta más de un 90% de neutralización del ECP a la dilución más baja (1:10). El título en el suero representa la dilución del suero más alta capaz de neutralizar más de un 90% del ECP en el cultivo tisular.

Un título de NV superior o igual a 1/10 suele considerarse específico del VNO. No obstante, debe tenerse en cuenta que las aves y los mamíferos podrían presentar reacciones cruzadas a este nivel tras la infección por los virus de la encefalitis japonesa o de la encefalitis de St. Louis, o tras la vacunación contra los mismos. También existe reactividad cruzada entre VNO y el virus Usutu, sin embargo, pueden atribuirse anticuerpos específicos a uno u otro virus ya que existe un título neutralizante de cuatro veces o más para un virus en comparación con el otro cuando se intentan detectar independientemente.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

En 2003, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) autorizó una vacuna contra el VNO inactivada con formalina y derivada de cultivos de tejidos para aplicación en caballos. El Comité de Medicamentos de Uso Veterinario (CMVP) aprobó este producto en 2008. En 2011, el USDA autorizó el uso de este producto en caimanes de forma condicionada. En 2004, una vacuna inactivada contra el VNO derivada de una línea celular humana obtuvo la autorización comercial en Israel como vacuna veterinaria para gansos. También se han autorizado vacunas basadas en la ingeniería genética, como se describe en el apartado C.3 *Vacunas basadas en la ingeniería genética*, a continuación. Se ha demostrado que estas vacunas son eficaces y seguras en los caballos vacunados adecuadamente. La vacunación puede ser útil para evitar los signos neurológicos asociados a la infección por el VNO.

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se indican en el capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las normas presentadas aquí y en el capítulo 1.1.8 son de naturaleza general y puedan suplementarse con requisitos nacionales o regionales.

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

2.1. Características del inóculo

Véase el capítulo 1.1.8 para requisitos generales de los inóculos primarios y pases permitidos para la producción de vacunas.

2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

La cepa del VNO utilizada como virus del inóculo primario para la producción de vacuna debe ir acompañada de la documentación que describa su origen y el historial de pases.

i) Vacunas inactivadas

Puede usarse virus virulento en vacunas inactivadas, siempre que los métodos de fabricación garanticen la total inactivación del MSV. La vacuna terminada debe ser inocua en el animal hospedador a la edad prevista de vacunación y aportar protección en caso de exposición.

ii) Vacunas vivas

El MSV debe ser inocuo en los animales hospedadores a la edad de mayor susceptibilidad a la infección. No debe aumentar la virulencia ni sufrir alteraciones genéticas detectables al aumentar el número de pases por animales hospedadores. Teóricamente, el MSV no debe ser excretado por los animales vacunados al medio ambiente; si ello ocurriera, la excreción deberá ser muy escasa y temporal. El MSV no debe afectar negativamente a especies no de destino con las que un animal vacunado pueda entrar en contacto. La vacuna terminada debe aportar protección en caso de exposición al virus.

iii) Vacunas recombinantes

Las vacunas recombinantes puede ser vivas o inactivadas, y los MSV recombinantes están afectados por las mismas directrices que los MSV convencionales. Además, los MSV recombinantes que expresen genes no propios deben producir de forma estable los antígenos contra dichos genes no propios.

iv) Vacunas de ADN

El MS es el organismo hospedador (por ejemplo, *Escherichia coli*) que expresa el plásmido que se utiliza en la vacuna. La vacuna de ADN terminada se somete a los requisitos mencionados arriba.

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

Debe comprobarse la pureza, identidad y ausencia de agentes extraños en el MSV antes de ser utilizado en la fabricación de la vacunas. El MSV debe estar libre de bacterias, hongos y micoplasmas. También debe estar libre de virus extraños, como herpesvirus equinos, adenovirus equinos, el virus de la arteritis vírica equina, el virus de la diarrea vírica bovina, reovirus y el virus de la rabia según la técnica de la inmunofluorescencia. El MSV debe estar libre de virus extraños, lo cual se determina comprobando la presencia de ECP o hemadsorción en la línea celular Vero y líneas de células equinas embrionarias.

2.1.3. Validación como cepa vacunal

En una prueba de inmunogenicidad, el MSV at máximo nivel de pases destinado a la producción debe proteger a los caballos susceptibles frente a una cepa virulenta a la que se expongan y que se halle en la zona geográfica en la que vaya a utilizarse la vacuna. Teóricamente, la cepa a la que se expongan y el MSV deben ser heterólogos. También debe comprobarse si el MSV destinado a ser utilizado en vacunas vivas también es inocuo en especies no de destino susceptibles, como ciertas aves.

2.1.4. Procedimiento de emergencia para la aceptación provisional de un nuevo virus de inóculo primario (MSV) a aplicar en caso de epizootia

En caso de que una cepa o variante emergente del VNO dé lugar a una situación de emergencia debida a una epizootia que no pueda controlarse mediante las vacunas de las que se disponga en ese momento, debe plantearse la posibilidad de aceptar provisionalmente un nuevo MSV, teóricamente para ser utilizado en una vacuna inactivada. Esta aceptación debe basarse en un análisis del riesgo de que el nuevo MSV esté contaminado por agentes extraños. En esta evaluación del riesgo deberán tenerse en cuenta la fuente y el historial de pases del MSV y las características del proceso de fabricación de la vacuna, incluido el tipo de agente inactivante del virus y su concentración.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

El MSV debe propagarse en líneas celulares que se sepa que permite el crecimiento del VNO. Véase el capítulo 1.1.8 para más información sobre la preparación y análisis de la reserva de inóculo primario. Las líneas celulares deben estar libres de virus extraños, bacterias, hongos y micoplasmas. La propagación del virus no debe superar los 5 pases desde el MSV, a no ser que esté demostrado que pases posteriores aportan protección al animal hospedador.

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

Se inoculan cultivos celulares directamente con la reserva de VNO de trabajo, que en general se encuentra a 1 a 4 pases respecto al MSV. Los cultivos inoculados se incuban durante 1–8 días antes de recolectar el medio de cultivo. Durante la incubación, se comprueba a diario si los cultivos presentan ECP o contaminación bacteriana.

Las vacunas inactivadas pueden inactivarse químicamente, o bien con formalina o bien con etilenimina binaria, y se mezclan con un adyuvante adecuado. La duración del periodo de inactivación depende de la cinética de inactivación observada.

Los casetes génicos de expresión de la vacuna de ADN se amplifican en *E. coli* (u otro vector adecuado). Los plásmidos purificados se formulan en una vacuna.

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

Todos los ingredientes utilizados en la fabricación de la vacuna contra el VNO deben estar definidos en protocolos de fabricación aprobados y ser constantes entre lotes. Véase el capítulo 1.1.8 para información general sobre los ingredientes de origen animal. Los ingredientes de

origen animal deben proceder de países con riesgo insignificante de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET).

2.2.3. Controles durante el proceso

Debe establecerse el título de los lotes de producción de VNO en cultivo tisular antes de la inactivación, con el fin de estandarizar el producto. Los lotes con títulos bajos pueden concentrarse o mezclarse con lotes de título alto para lograr el título correcto.

Debe comprobarse si los lotes de VNO inactivado están totalmente inactivados. Los protocolos cuentan con pasos de concentración y amplificación, para mejorar la detección de virus vivo residual.

Los lotes de producción de ADN se cuantifican mediante métodos analíticos y se caracterizan antes de la estandarización y mezcla al nivel adecuado de contenido en ADN. Los lotes de producción no debe superar el nivel máximo permitido de contenido en lipopolisacárido (LPS), que se determina mediante pruebas de inocuidad.

2.2.4. Pruebas en lotes de producto terminado

i) Esterilidad

Se realizan pruebas de contaminación bacteriana y fúngica en muestras de vacuna inactivada y viva. El volumen de medio utilizado en estas pruebas debe ser suficiente como para anular todo posible efecto bacteriostático o fungistático de los conservantes del producto. Para determinar la presencia de bacterias, se inoculan en diez frascos, cada uno de los cuales contiene como mínimo 120 ml de medio de digestión de caseína soja, 0,2 ml de diez muestras del recipiente final. Los diez frascos se incuban a 30–35°C durante 10 días y se comprueba si presentan crecimiento bacteriano. Para determinar la presencia de hongos, se inoculan en diez frascos, cada uno de los cuales contiene como mínimo 40 ml de medio de digestión de caseína soja, 0,2 ml de diez muestras del recipiente final. Los diez frascos se incuban a 20–25°C durante 10 días y se comprueba si presentan crecimiento fúngico. Es posible que en determinados países existan otros requisitos.

ii) Identidad

Deben llevarse a cabo pruebas de identidad independientes para cada lote cuando la prueba de potencia del lote, como las titulaciones de vacunas de virus vivo en cultivo tisular, no verifica de forma suficiente la identidad del agente presente en la vacuna. Las pruebas de identidad pueden consistir en inmunofluorescencia o neutralización en suero.

Además, si no se aplican procesos de fabricación y desinfección todo dentro-todo fuera y en un laboratorio se propaga más de un agente, las pruebas de identidad deberán poner de manifiesto que no hay ninguna otra cepa vacunal.

iii) Inocuidad

En muchas regiones, no se requieren pruebas de inocuidad en las especies de destino para la puesta en circulación de los lotes. Cuando es necesario, los procedimientos estándar generalmente se llevan a cabo utilizando menos animales que los utilizados en las pruebas de inocuidad requeridas para la aprobación por parte de las autoridades reguladoras correspondientes.

Pueden realizarse pruebas de inocuidad del lote en cobayas, ratones o animales hospedadores. El producto debe administrarse según las recomendaciones de la etiqueta en los animales hospedadores. Es posible que en determinados países se requieran pruebas de sobredosis (por ejemplo, de entre el doble y diez veces la dosis recomendada). Tras la vacunación no puede producirse ninguna reacción adversa ni sistémica ni local.

El requisito de la prueba de inocuidad del lote *in vivo* puede no aplicarse si la inocuidad del producto se demuestra y queda aprobada en el dossier de registro, y si la producción

concuera con lo descrito en los capítulos 1.1.8 y 2.3.3 *Requisitos mínimos para la organización y la gestión de un centro de fabricación de vacunas*.

iv) Potencia del lote

Para las vacunas de virus muerto se emplean pruebas de vacunación/serología o de vacunación/exposición con animales hospedadores o animales de laboratorio, con el fin de determinar la potencia del producto final. Las técnicas *in vitro* para comparar un patrón con el producto final también son aceptables para determinar la potencia relativa de un producto (USDA, 2011). Debe demostrarse que el patrón aporta protección al animal hospedador.

Los productos víricos vivos se titulan en cultivos celulares para determinar la potencia del producto final. Respecto de la dosis protectora mínima establecida en la prueba de inmunogenicidad, el título de potencia del lote exigido en el momento de la liberación debe incluir cierto margen, teniendo en cuenta la variabilidad analítica entre lotes y la pérdida de potencia que tendrá lugar con el tiempo. En ausencia de datos específicos que respalden una alternativa, se recomiendan márgenes de 0,7 log₁₀ y 0,5 log₁₀, respectivamente.

En las vacunas de ADN puede determinarse la actividad biológica y el contenido en ADN empleando métodos directos de cuantificación de línea paralela que comparen una preparación estándar con el producto final.

2.3. Requisitos de autorización/registro/licencia

2.3.1. Proceso de fabricación

Para el registro de una vacuna contra el VNO, deben presentarse a las autoridades todos los detalles relevantes relativos a la fabricación de la vacuna, los controles realizados durante el proceso y las pruebas de control de calidad (véanse los apartados C.2.1 *Características del inóculo* y C.2.2 *Método de fabricación*). Deberán aportarse los resultados de pruebas realizadas en tres lotes consecutivos de la vacuna, con un volumen no inferior a 1/3 del volumen habitual del lote industrial.

2.3.2. Requisitos de inocuidad

La inocuidad inherente de la cepa vacunal, si va a utilizarse en la fabricación de una vacuna viva, se analiza en a nivel de Inóculo Primario:

i) Inocuidad en animales de destino y no de destino

El Inóculo debe probarse en animales hospedadores de la edad más susceptible. Se comprobará si los animales presentan enfermedad clínica y si excretan/diseminan el virus. La dosis de microorganismo no debe ser inferior a la esperable en la vacuna terminada. Es posible que en determinados países se requieran pruebas de sobredosis. Si la vacuna va destinada a ser utilizada en sub-poblaciones específicas (por ejemplo, animales gestantes), estos también deberán incluirse en los estudios de inocuidad en animales de destino. Además, deberán llevarse a cabo estudios similares en especies susceptibles no de destino (como las aves).

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas y consideraciones en cuanto al medio ambiente

Debe comprobarse que los pases repetidos *in vivo* del MSV no aumentan su virulencia. (Para más información, véase el apartado: *Pruebas de aumento de la virulencia* en el capítulo 1.1.8).

La formulación vacunal final (inactivada o viva) debe probarse en un número reducido de animales de destino antes de llevar a cabo un estudio de campo a gran escala. La formulación final de la vacuna no debe causar reacciones adversas.

Para que la vacuna pueda recibir la autorización definitiva, deben realizarse estudios de campo sobre inocuidad. En general, deben emplearse dos series, en tres ubicaciones geográficas distintas y aplicando las condiciones de cría animal habituales, y con al menos 600 animales. La vacuna debe administrarse según las recomendaciones de la etiqueta (incluidas las dosis de refuerzo) y debe contener la cantidad máxima permitida de antígeno del VNO. (Si no existe una cantidad máxima de antígeno especificada, las series deben tener la potencia habitual prevista post-comercialización). Alrededor de un tercio de los animales debe encontrarse en la edad mínima recomendada para la vacunación.

iii) Precauciones (peligros)

La vacuna debe identificarse como perjudicial o patógena para el personal que la administre. Los fabricantes deben advertir claramente que debe acudir al médico en caso de auto-inyección. Deben incluirse advertencias en la ficha técnica/prospecto del producto para que la persona que lo administre sea consciente del peligro.

2.3.3. Requisitos de eficacia

Para registrar la vacuna contra el VNO, un lote producido según el método estándar y que contenga la cantidad mínima de antígeno o nivel de potencia debe proporcionar protección contra la exposición a un virus virulento en un animal de la edad mínima recomendada para la vacunación. Cada futuro lote comercial deberá ser analizado antes de ser liberado, para asegurarse de que tiene al menos la potencia que se ha comprobado en el lote utilizado para el estudio de eficacia.

La eficacia de la vacuna contra el VNO a menudo se estima en caballos vacunados evaluando la viremia y/o los signos neurológicos (como fasciculación muscular, ataxia o convulsiones) tras la exposición al virus. La eficacia se estima en caimanes evaluando la viremia y/o lesiones cutáneas linfocitocíticas tras la exposición al virus. Se recomienda realizar estas comprobaciones con 25 animales vacunados y 10 animales control vacunados con placebo.

Se puede exponer a los caballos por vía intracecal o mediante la exposición a mosquitos infectados. Los caimanes pueden exponerse por vía subcutánea. En todos los animales debe realizarse un seguimiento durante 14–21 días tras la exposición. La viremia debe evaluarse de forma cualitativa (es decir, presencia detectable o ausencia) mediante pruebas validadas. El efecto de la vacunación puede evaluarse calculando la fracción prevenida con un intervalo de confianza del 95%. En determinados países puede haber requisitos de eficacia mínima, pero el intervalo de confianza en ningún caso puede incluir el valor cero.

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

La vacunación solo se recomienda para caballos y caimanes en zonas positivas al VNO. Los caballos vacunados pueden desarrollar un título serológico que puede interferir con la posibilidad de exportar al caballo.

2.3.5. Duración de la inmunidad

Para que la vacuna reciba la autorización final, deben llevarse a cabo estudios para determinar la duración mínima de la inmunidad. La duración de la inmunidad debe demostrarse de forma similar a como se hace en el estudio original de eficacia, exponiendo a los animales al final del periodo de protección indicado. La inmunidad debe durar al menos lo que dura el periodo de actividad del mosquito en zonas infectadas estacionalmente. Tal vez se desee demostrar una inmunidad más duradera para animales de mayor riesgo y para zonas infectadas por mosquitos que presentan actividad durante todo el año.

2.3.6. Estabilidad

A las vacunas vivas e inactivadas se les suelen asignar fechas de caducidad a 18 y 24 meses, respectivamente. Para confirmar la idoneidad de las fechas de caducidad deben llevarse a cabo pruebas de estabilidad en tiempo real. El etiquetado del producto debe especificar cuáles son las condiciones de almacenaje necesarias.

3. Vacunas basadas en la ingeniería genética

En 2003, el USDA autorizó una vacuna viva contra el VNO con un canarypoxvirus como vector, para caballos. En 2005, el USDA autorizó la primera vacuna de ADN contra el VNO para animales de EE.UU. con licencia completa. Esta vacuna contiene genes para dos proteínas del VNO, y por lo tanto no contiene ningún VNO entero, ni vivo ni muerto. A finales de 2006, la USDA autorizó una vacuna quimérica basada en un vector del virus de la fiebre amarilla (Fam), para caballos. El CMVP aprobó un producto recombinante basado en virus canarypox y VNO en 2011 y un producto FAM-VNO basado en una cepa de flavivirus quimérica inactivada. Además de cumplir los requisitos de eficacia, potencia, pureza e inocuidad, los inóculos recombinantes deben superar un análisis del riesgo. La conclusión del análisis del riesgo debe ser que la vacuna no ejerce un impacto medioambiental significativo.

BIBLIOGRAFÍA

AUSTIN R.J., WHITING T.L., ANDERSON R.A. & DREBOT M.A. (2004). An outbreak of West Nile virus-associated disease in domestic geese (*Anser anser domesticus*) upon initial introduction to a geographic region, with evidence of bird to bird transmission. *Can. Vet. J.*, **45**, 117–123.

BAKONYI T., IVANICS E., ERDELYI K., URSU K., FERENCZI E., WEISSENBOCK H. & NOWOTNY N. (2006). Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile Virus, central Europe. *Emerging Infect. Dis.*, **12**, 618–623.

BEATY B.J., CALISHER C.H. & SHOPE R.E. (1989). Arboviruses. In: Diagnostic Procedures for Viral Rickettsial and Chlamydial infections, Sixth Edition, Schmidt N.H. & Emmons R.W., eds. American Public Health Association, Washington DC, USA, 797–856.

BERTHET F.-X., ZELLER H.G., DROUET M.-T., RAUZIER J., DIGOUTTE J.-P. & DEUBEL V. (1997). Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *J. Gen. Virol.*, **78**, 2293–2297.

BUNNING M.L., BOWEN R.A., CROPP B.C., SULLIVAN K.G., DAVIS B.S., KOMAR N., GODSEY M., BAKER D., HETTLER D.L., HOLMES D.A., BIGGERSTAFF B.J. & MITCHELL C.J. (2002). Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 380–386.

BURKE D.S. & MONATH T.P. (2001). Flaviviruses. In: Fields Virology, Fourth Edition, Knipe D.M. & Howley P.M., eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 1043–1125.

BURT F.J., GROBBELAAR A.A., LEMAN P.A., ANTHONY F.S., GIBSON G.V.F. & SWANEPOEL R. (2002). Phylogenetic relationships of Southern African West Nile virus isolates. *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 820–826.

CAMPBELL G., LANCIOTTI R., BERNARD B. & LU H. (2002). Laboratory-acquired West Nile virus infections – United States, 2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, **51**, 1133–1135.

<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5150a2.htm>

CANTILE C., DI GUARDO G., ELENI C. & ARISPICI M. (2000). Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Vet. J.*, **32**, 31–35.

DANIS K., PAPA A., PAPANIKOLAOU E., DOUGAS G., TERZAKI I., BAKA A., VRIONI G., KAPSIMALI V., TSAKRIS A., KANSOUZIDOU A., TSIODRAS S., VAKALIS N., BONOVAS S. & KREMASTINOU J. (2011). Ongoing outbreak of West Nile virus infection in humans, Greece, July to August 2011. *Eurosurveillance*, **16**, pii: 19951.

DAVIS B.S., CHANG G.J., CROPP B., ROEHRIG J.T., MARTIN D.A., MITCHELL C.J., BOWEN R. & BUNNING M.L. (2001). West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses *in vitro* a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Virol.*, **75**, 4040–4047.

DI GENNARO A., LORUSSO A., CASACCIA C., CONTE A., MONACO F. & SAVINI G. (2014). Serum neutralization assay can efficiently replace plaque reduction neutralization test for detection and quantitation of West Nile virus antibodies in human and animal serum samples. *Clin. Vaccine Immunol.*, **10**, 1460–1462.

- EIDEN M., VINA-RODRIGUEZ A., HOFFMANN B., ZIEGLER U. & GROSCHEP M.H. (2010). Two new real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays with unique target sites for the specific and sensitive detection of lineages 1 and 2 West Nile virus strains. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **22**, 748–753.
- FROST M.J., ZHANG J., EDMONDS J.H., PROW N. A., GU X., DAVIS R., HORNITZKY C., ARZEY K.E., FINALAISON D., HICK P., READ A., HOBSON-PETERS J., MAY F.J., DOGGETT S.L., HANIOTIS J., RUSSELL R.C., HALL R.A., KHROMYKH A.A. & KIRKLAND P.D. (2012). Characterization of virulent West Nile virus Kunjin strain, Australia, 2011. *Emerg. Infect. Dis.*, **18**, 792–800.
- HALL R.A., SCHERRET J.H. & MACKENZIE J.S. (2001). Kunjin Virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **951**, 153–160.
- HAYES C.G. (1989). West Nile fever. In: *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, Vol. 5, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 59–88.
- JOHNSON D.J., OSTLUND E.N., PEDERSEN D.D. & SCHMITT B.J. (2001). Detection of North American West Nile virus in animal tissue by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 739–741.
- JOSEPH S., WERNERY U., TENG J.L., WERNERY R., HUANG Y., PATERIL N.A., CHAN K.H., ELIZABETH S.K., FAN R.Y., LAU S.K., KINNE J., WOO P.C. (2016). First isolation of West Nile virus from a dromedary camel. *Emerg. Microbes Infect.*, **5**, e53.
- LANCIOTTI R.S., KERST A.J., NASCI R.S., GODSEY M.S., MITCHELL C.J., SAVAGE H.M., KOMAR N., PANELLA N.A., ALLEN B.C., VOLPE K.E., DAVIS B.S. & ROEHRIG J.T. (2000). Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 4066–4071.
- MACKENZIE J.S. & WILLIAMS D.T. (2009). The zoonotic flaviviruses of southern, south-eastern and eastern Asia, and Australasia: the potential for emergent viruses. *Zoonoses Public Health*, **56**, 338–356.
- MORALES M.A., BARRANDEGUY M., FABBRI C., GARCIA J.B., VISSANI A., TRONO K., GUTIERREZ G., PIGRETTI S., MENCHACA H., GARRIDO N., TAYLOR N., FERNANDEZ F., LEVIS S. & ENRIA D. (2006). West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg. Infect. Dis.*, **12**, 1559–1561.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH): NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES (NIAID) (2015). <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-funded-vaccine-west-nile-virus-enters-human-clinical-trials>
- OSTLUND E.N., ANDRESEN J.E. & ANDRESEN M. (2000). West Nile encephalitis. *Vet. Clin. North Am., Equine Pract.*, **16**, 427–441.
- OSTLUND E.N., CROM R.L., PEDERSEN D.D., JOHNSON D.J., WILLIAMS W.O. & SCHMITT B.J. (2001). Equine West Nile encephalitis, United States. *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 665–669.
- PANTHIER R., HANNOUN C.L., OUDAR J., BEYTOUT D., CORNIOU B., JOUBERT L., GUILLON J.C. & MOUCHET J. (1966). Isolement du virus West Nile chez un cheval de Camargue atteint d'encéphalomyélite. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, **262**, 1308–1310.
- PLATONOV A.E., KARAN L.S., SHOPENSKAIA T.A., FEDOROVA M.V., KOLIASNIKOVA N.M., RUSAKOVA N.M., SHISHKINA L.V., ARSHBA T.E., ZHURAVLEV V.I., GOVORUKHINA M.V., VALENTSEVA A.A. & SHIPULIN G.A. (2011). Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, **2**, 29–37.
- SAVINI G., CAPELLI G., MONACO F., POLCI A., RUSSO F., DI GENNARO A., MARINI V., TEODORI L., MONTARSI F., PINONI C., PISCIELLA M., TERREGINO C., MARANGON S., CAPUA I. & LELLI R. (2012). Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy. *Vet Microbiol.*, **158**, 264–274.
- SCHMIDT J.R. & EL MANSOURY H.K. (1963). Natural and experimental infection of Egyptian equines with West Nile virus. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **57**, 415–427.
- SIRBU A., CEIANU C.S., PANCULESCU-GATEJ R.I., VAZQUEZ A., TENORIO A., REBREANU R., NIEDRIG M., NICOLESCU G., & PISTOL A. (2011). Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *EuroSurveill.* JAN 13, **16** (2).

SMITHBURN K.C., HUGHES T. P., BURKE A.W. & PAUL J.H. (1940). A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am. J. Trop. Med.*, **20**, 471–492.

SNOOK C.S., HYMAN S.S., DEL PIERO F., PALMER J.E., OSTLUND E.N. BARR B.S., DEROSCHERS A.M. & REILLY L.K. (2001). West Nile virus encephalomyelitis in eight horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **218**, 1576–1579.

STEELE K.E., LINN M.J., SCHOEPP R.J., KOMAR N., GEISBERT T.W., MANDUCA R.M., CALLE P.P., RAPHAEL B.L., CLIPPINGER T.L., LARSEN T., SMITH J., LANCIOTTI R.S., PANELLA N.A. & McNAMARA T.S. (2000). Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York. *Vet. Pathol.*, **37**, 208–224.

VAZQUEZ A., SANCHEZ-SECO M.P., RUIZ S., MOLERO F., HERNANDEZ L., MORENO J., MAGALLANES A., TEJEDOR C.G. & TENORIO A. (2010). Putative new lineage of West Nile virus, Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, **16**, 549–552.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (2011). Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services Memorandum 800.112 Guidelines for Validation of *In Vitro* Potency Assays at: URL: http://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/memo_800_112.pdf

WEINGARTL H.M., DREBOT M.A., HUBALEK Z., HALOUZKA J., ANDONOVA M., DIBERNARDO A., COTTAM-BIRT C., LARENCE J. & MARSZAL P. (2003). Comparison of assays for detection of West Nile virus antibodies in chicken sera. *Can. J. Vet. Res.*, **67**, 128–132.

WODAK E., RICHTER S., BAGO Z., REVILLA-FERNANDEZ S., WEISSENBOCK H. NOWOTNY N. & WINTER P. (2011). Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009. *Vet. Microbiol.*, **149**, 358–366.

ZELLER H.G. & SCHUFFENECKER I. (2004). West Nile virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean Basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **23**, 147–156.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia para la fiebre del Nilo occidental
(puede consultarse la página web de la OIE:

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

Para más información sobre pruebas de diagnóstico, reactivos y vacunas para la fiebre del Nilo occidental, por favor contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2004 COMO ENCEFALITIS DEL NILO OCCIDENTAL.
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.