

## SECCIÓN 3.9.

# OTRAS ENFERMEDADES<sup>1</sup>

---

### CAPÍTULO 3.9.1.

## ENFERMEDADES BUNYAVIRALES DE ANIMALES (excluyendo la fiebre del Valle del Rift y la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo)\*

### RESUMEN

La familia Bunyaviridae está formada por más de 30 miembros distribuidos en cinco géneros. Todos los virus de estos géneros excepto los hantavirus se transmiten a los vertebrados mediante artrópodos (arbovirus). Los géneros de importancia en veterinaria son Nairovirus, Orthobunyavirus y Phlebovirus. Nairovirus contiene el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (véase el Capítulo 3.1.5) y el virus de enfermedad ovina de Nairobi (EON), patógeno para los rumiantes. El género más amplio, Orthobunyavirus, que se subdivide en 48 serogrupos, e incluye algunos agentes patógenos importantes de los animales. Este género comprende solo unos pocos virus patógenos significativos para los animales, entre ellos el virus del Valle de Cache (VVC) y el virus Akabane (VAKA), además del virus Schmallenberg (VSB). Estos virus manifiestan tropismo por los tejidos fetales y son los responsables de muertes fetales y de múltiples deformidades congénitas en rumiantes domésticos. El VSB, un Orthobunyavirus de reciente descubrimiento emergió en 2011 en Europa. Este virus se halló en corderos, cabritos y terneros con malformaciones en varios países europeos y se propagó a la mayor parte del continente. Otro miembro de la familia Bunyaviridae que tiene importancia veterinaria es el virus de la fiebre del Valle del Rift, un miembro del género Phlebovirus, que se describe en el Capítulo 3.1.18 Fiebre del valle del Rift.

Los miembros de los géneros Nairovirus y Orthobunyavirus son virus de ARN esféricos con envoltura o pleomórficos, de 80–100 nm de diámetro, con tres segmentos genómicos (S, M y L), y de polaridad negativa.

#### **Identificación del agente:**

El VVC, un miembro del serogrupo de virus Bunyamwera del género Orthobunyaviridae, se puede aislar a partir de animales adultos virémicos o febriles. Los intentos de aislarlo a partir de fetos recién nacidos son generalmente infructuosos por el reducido número de virus debido a la respuesta inmune fetal. Para aislar el virus se emplean líneas celulares derivadas de riñón de mono verde africano (Vero) riñón de hámster neonato (BHK) o, alternativamente, se puede utilizar la inoculación intracerebral de cría de ratón. El virus se identifica mediante la prueba de la inmunofluorescencia (FA), inmunohistoquímica (IHC) o la prueba de neutralización (VN). Se han desarrollado técnicas que emplean la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específicas de grupo y de virus para Orthobunyavirus.

El VAKA puede aislarse a partir de la sangre de animales virémicos y ocasionalmente a partir de material fetal y se utilizan líneas celulares de mosquito. El virus o el antígeno se identifican

---

<sup>1</sup> Las enfermedades de esta sección que están marcadas con un asterisco se incluyen en algunas secciones de especies individuales de la Lista de la OIE, sin embargo estos capítulos del *Manual Terrestre* abarcan varias especies y por consiguiente brindan una descripción más amplia.

mediante FA, IHC o VN. Se han desarrollado técnicas PCR de transcriptasa inversa en tiempo real múltiple y anidada para el virus Akabane y otros virus relacionados.

El VSB se puede aislar a partir de la sangre de animales adultos virémicos, y en ocasiones de tejidos o fetos infectados, sobre todo de materia encefálica, empleando distintas líneas celulares: células de insecto (KC), BHK o Vero. No obstante, el aislamiento puede ser difícil y la adaptación al cultivo celular es necesaria para el crecimiento in vitro del VSB. Se han establecido RT-PCR en tiempo real y existen kits de PCR que permiten una detección sensible y específica del virus en la sangre de rumiantes con infección aguda, así como en órganos y sangre de fetos infectados, como el encéfalo, la placenta, el líquido amniótico o el meconio. No obstante, la detección del genoma del VSB es posible solo en una parte de los fetos infectados y malformados y no funciona igual de bien en todos los tejidos debido al aclaramiento del virus durante la gestación.

El virus de la enfermedad ovina de Nairobi (EON) se aísla mejor a partir de plasma procedente de animales febriles, ganglios linfáticos mesentéricos o bazo. La línea celular BHK y los cultivos de células de riñón de cordero o de hámster son las células más sensibles. La identificación del virus puede realizarse mediante FA en cultivos tisulares inoculados, y mediante la prueba de la inmunodifusión en gel de agar también puede comprobarse la presencia del antígeno de la NSD en tejidos, pero se produce reacción cruzada con otros virus del género Nairovirus. Se pueden utilizar cultivos de tejidos infectados como fuentes de antígeno para pruebas de fijación del complemento o de enzimoanálisis (ELISA).

**Pruebas serológicas:** Para detectar los anticuerpos frente al VVC y al virus VAKA se emplea el ELISA y la VN. También se ha publicado y se está comercializando una técnica de competición específica para Akabane. En el caso del VSB, se utiliza ELISA (ELISA indirecto y de bloque comerciales), la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFA) y pruebas de VN para detectar anticuerpos contra el VSB en muestras de suero. Para la EON la prueba más adecuada es la IFA. Igualmente se utilizan las pruebas FC y la de hemoaglutinación indirecta para confirmar los brotes de la EON en el medio natural. En las pruebas de neutralización vírica se obtienen resultados ambiguos, un rasgo que comparte con otros miembros del grupo Nairovirus. Se están evaluando técnicas ELISA para la EON. Se puede utilizar bazo infectado como fuente antigénica en las pruebas de inmunodifusión.

**Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico:** Actualmente no se dispone de vacuna para el VVC. Se han producido vacunas contra el virus Akabane. En el caso de la EON, se ha estudiado una vacuna experimental con virus vivo atenuado, y se ha observado inmunogenicidad en una vacuna muerta preparada a partir de cultivo tisular. En 2013, ciertas vacunas inactivadas contra el VSB recibieron una autorización provisional de comercialización en algunos países europeos, como el Reino Unido y Francia.

## A. INTRODUCCIÓN

Los bunyavirus varían en cuanto a su capacidad de infección en el ser humano, como se indica en la siguiente descripción de cada virus. Deben llevarse a cabo evaluaciones específicas del riesgo, como se describe en 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 determinar tanto las medidas de bioseguridad como de biocontención necesarias para manipular materiales infecciosos en el laboratorio.

### 1. El virus del Valle de Cache

El virus del Valle de Cache (VVC) es un *Orthobunyavirus* teratógeno de Norteamérica que afecta sobre todo a las ovejas. La infección experimental de fetos ovinos ha confirmado el papel que desempeña el VVC en la aparición de malformaciones (Rodrigues Hoffman *et al.*, 2012). En una reciente investigación del ganado se indicó que hasta un 28% era positivo a anticuerpos específicos contra VVC (Sahu *et al.*, 2002). Es miembro del serogrupo Bunyamwera del género *Orthobunyavirus* de la familia *Bunyaviridae* (Fauquet *et al.*, 2005) y es el más común de los *Orthobunyavirus* de Norteamérica (Calisher *et al.*, 1986). El VVC se aisló por primera vez de una charca con mosquitos en Utah, Estados Unidos de América (EE.UU) en 1956 (Holden & Hess, 1959), pero solo se le relacionó con la enfermedad a partir de la aparición de una pérdida neonatal y de corderos con malformaciones en un rebaño de ovejas en Tejas en 1987 (Crandell *et al.*, 1989). El virus también se aisló de un caballo y de una vaca clínicamente sana.

Las investigaciones serológicas han demostrado una amplia prevalencia de anticuerpos en rumiantes domésticos y salvajes y en caballos. La seroprevalencia al VVC es elevada en los ciervos, y es suficiente una viremia de entre 1 y 3 días para infectar vectores, permitiendo a los ciervos actuar como hospedadores propagadores (Blackmore & Grimstad, 1998). Los vectores incluyen pequeñas moscas *Culicoides* y mosquitos de los grupos *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia* y *Culiseta*.

La infección de animales adultos por VVC es, en gran medida, subclínica, y las ovejas infectadas experimentalmente muestran solo una respuesta febril transitoria, pero con una viremia detectable. Se ha informado de la enfermedad en humanos en dos ocasiones (Campbell *et al.*, 2006; Sexton *et al.*, 1997).

El VVC fue el primer *Orthobunyavirus* de Norteamérica asociado a la artrogriposis y la hidrocefalia fetales; sin embargo, se ha demostrado experimentalmente que otros virus relacionados tienen el mismo potencial. La evolución clínica de la infección fetal por VVC depende de la edad. Las malformaciones se producen entre los 27 y 45 días de gestación, y, entre los 28 y 36 días, la infección provoca defectos musculoesqueléticos y del sistema nervioso central (SNC), y entre los 37 y 42 días, la infección produce solamente deformaciones musculoesqueléticas. La infección después de 50 días de gestación no produce lesiones, y, después de 76 días, el feto es inmunocompetente y se producen anticuerpos. La mayor parte de las muertes fetales por VVC se producen entre los días 27 y 35 de gestación. Sin embargo, el feto es susceptible a cualquier edad, lo que demuestra el tropismo de muchos *Orthobunyavirus* por los tejidos fetales (Chung *et al.*, 1990).

Las lesiones anatomopatológicas macroscópicas del sistema musculoesquelético son la artrogriposis de uno o más miembros, la torticolis, la escoliosis de la columna vertebral y la hipoplasia muscular. Las lesiones del SNC comprenden hidrocefalia, hidrocéfalo, pencefalia, microcefalia, hipoplasia cerebral y del cerebelo y micromelia (Chung *et al.*, 1990; Edwards *et al.*, 1997). También se encuentran embriones muertos y corderos nacidos muertos o momificados con defectos inapreciables. Se aprecia anasarca, así como oligohidramnios. Se cree que esta reducción del líquido amniótico contribuye a la restricción del movimiento fetal y a las deformaciones esqueléticas que se observan. Los defectos en los miembros son debidos también a cambios neurodegenerativos vistos histopatológicamente como áreas de necrosis y pérdida del neuropilo paraventricular del cerebro junto con una reducción del número de neuronas motoras. Los cambios en el músculo esquelético acarrearán miocitos miotubulares escasamente desarrollados (Edwards *et al.*, 1997).

## 2. El virus Akabane

El virus Akabane (VAKA) es un *Orthobunyavirus* teratogénico ampliamente distribuido por todo el mundo pero no en las Américas. Afecta principalmente al ganado vacuno. Es un miembro del serogrupo Simbu<sup>2</sup> del género *Orthobunyavirus*, familia Bunyaviridae (Karabatsos, 1985). Otros posibles patógenos del serogrupo Simbu son los virus Aino, Peaton, Schmallerberg, Shamonda y Tinaroo. El virus VAKA es una causa importante de artrogriposis y de hidrocefalia. En infecciones experimentales de terneros neonatos y de ovejas gestantes se ha observado que los virus Aino y Peaton pueden causar malformaciones en los rumiantes (Parsonson *et al.*, 1982; Tsuda *et al.*, 2004), pero el virus Peaton nunca se ha asociado a la enfermedad en condiciones de campo. El virus Aino ha causado brotes de anomalías congénitas en rumiantes en Japón y una vez en Australia.

El virus Akabane fue aislado por primera vez en 1959, inicialmente a partir de una charca con mosquitos y después de una charca con quiromónidos del género *Culicoides*. A esto le siguieron, en 1972, aislamientos a partir de *Culicoides* en Australia y de charcas con mosquitos en África. Se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra el virus Akabane en el suero de vacas, ovejas, cabras, caballos, búfalos y camellos. Muchas especies de caza autóctonas del África subsahariana tienen anticuerpos neutralizantes del virus Akabane. El radio de acción del virus Akabane incluye Oriente Medio, Asia, Chipre, África y Australia. Se producen epizootias de la enfermedad de Akabane esporádicamente en países como Australia e Israel, donde no se suele practicar la vacunación. Suelen producirse brotes cuando las condiciones son favorables para los vectores y se desplazan saliendo de la zona endémica e introduciéndose en poblaciones de animales susceptibles que se encuentran en las fases inicial-intermedia de la gestación o cuando el virus ha estado ausente de una zona endémica durante uno o más años, normalmente como consecuencia de una sequía.

La infección por el VAKA en animales adultos suele ser subclínica, pero se ha asociado a encefalomiелitis en ganado bovino adulto en Japón (Lee *et al.*, 2002; Miyazato *et al.*, 1989). El ganado bovino seroconvierte tras una viremia de 3-4 días.

En zonas endémicas, las hembras se infectan antes de alcanzar la edad de la reproducción y los anticuerpos de las hembras previenen la infección fetal. En general, puede observarse la enfermedad en el feto de hembras nunca antes expuestas cuando se produce la infección entre los días 30 y 70 de gestación, en el caso de la oveja, y entre los días 70 y 150 de gestación en el caso de la vaca. En etapas más avanzadas de la gestación,

2 La clasificación actual del Comité Internacional sobre Taxonomía de los Virus no reconoce el término “serogrupo” para los bunyavirus. Se utiliza en este capítulo por motivos de comodidad.

los defectos congénitos son leves e infrecuentes, aunque la infección del feto bovino por ciertas cepas del VAKA cerca del final de la gestación puede dar lugar al nacimiento de terneros con encefalitis. El VAKA tiene predilección por células del encéfalo, la médula espinal y el músculo esquelético, en las que una necrosis no inflamatoria interfiere con la morfogénesis.

La infección por el virus Akabane se ha estudiado experimentalmente en ovejas y cabras, y se aprecia artrogriposis/hidrocefalia, cifosis, escoliosis, micro- y porencefalia, nacidos muertos y abortos (Parsonson *et al.*, 1975). Se ha descrito la infección natural de los fetos ovino y caprino en Australia, donde lo que con mayor frecuencia se ha observado ha sido la mortalidad del cordero perinatal y la microcefalia congénita.

Se han llevado a cabo estudios experimentales con el VAKA en vacas gestantes, y de los mismos se extrae la conclusión de que el tipo de anomalía depende de la edad de gestación del feto, observándose hidrocefalia entre los días 76–104 de la gestación y artrogriposis entre los días 103–174 (Kirkland *et al.*, 1988). La diferencia en el tiempo de aparición de las anomalías se ha visto claramente en fetos bovinos mientras que en ovejas, con un periodo de gestación más corto, las lesiones esqueléticas y cerebrales aparecen simultáneamente en el feto. La secuencia de sucesos durante una epizootia de pérdida fetal inducida por el virus Akabane comienza con el nacimiento de vacas con descoordinación, seguido de casos de artrogriposis y cambios musculares displásicos y, por último, vacas con hidrocefalo y otras lesiones graves del SNC. Estos sucesos pueden estar precedidos de mortinatos y de abortos (Shepherd *et al.*, 1978). El virus Akabane es el responsable de graves anomalías musculares y neuronales, y las lesiones se caracterizan por encefalomiелitis no purulenta, por encefalomiелopatía degenerativa cerebral focal, porencefalia, microencefalia, hidrocefalo, pérdida de axones y de neuronas motoras del asta ventricular, agotamiento de la mielina del tracto motor de la médula espinal, necrosis y poliomiositis en los miotúbulos con degeneración parenquimatosa de los músculos esqueléticos. Las anomalías de la médula espinal incluyen escoliosis y cifosis, y la artrogriposis puede afectar casi a cualquier articulación esquelética.

### 3. El virus Schmallenberg

El VSB se detectó por primera vez en noviembre de 2011 en Alemania a partir de muestras obtenidas en octubre del mismo año en ganado vacuno lechero con fiebre y reducción de la producción de leche. Se detectaron signos clínicos similares (incluida diarrea) en vacas lecheras de los Países Bajos, donde la presencia del VSB también se confirmó en diciembre de 2011. Desde principios de aquel mes de diciembre, se notificaron malformaciones congénitas en corderos neonatos de los Países Bajos, y se detectó el VSB en una cepa aislada del tejido encefálico. Desde entonces, el VSB se ha detectado en muchos países europeos, así como en Kazajistán. También se ha sospechado de infección pasada en Turquía y en Sudáfrica.

El VSB es un virus ARN con envoltura, de polaridad negativa, segmentado y monocatenario. Pertenece a la familia *Bunyaviridae*, género *Orthobunyavirus*, y es uno de los virus del serogrupo Simbu, que incluye los virus Sathuperi, Akabane y Aino (Hoffman *et al.*, 2011). En un análisis filogenético reciente de varios virus del serogrupo Simbu se ha establecido que el VSB no es recombinante, y se relaciona principalmente con especies del virus Sathuperi. Un virus estrechamente relacionado dentro de esta especie es el virus Douglas australiano (Goller *et al.*, 2012). Es importante destacar que hasta 2011 en Europa nunca se habían aislado virus del serogrupo Simbu.

Como ocurre en los virus relacionados genéticamente del serogrupo Simbu, el VSB afecta a los rumiantes. La infección del ganado bovino, las ovejas, las cabras, los corzos y los bisontes se ha confirmado tanto por reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en tiempo real como por aislamiento del virus (Bilk *et al.*, 2012; Hoffmann *et al.*, 2012). Se han hallado anticuerpos en corzos, alpacas y muflones.

La infección experimental en ganado bovino y ovejas no mostró signos clínicos ni leves a los 3–5 días de la inoculación, y se observó un periodo de incubación de 2–4 días y una viremia que duró 2-5 días (Hoffmann *et al.*, 2012, Wernike *et al.*, 2013).

La transmisión tiene lugar por vectores insectos y a continuación por vía vertical *in utero*. El genoma del VSB se ha detectado en varias especies de *Culicoides*. Se precisa más información para determinar cuáles son las especies de insectos competentes y si es posible que los mosquitos intervengan. La transmisión vertical a través de la placenta se ha demostrado, pero la contaminación directa entre animales es muy improbable. La infección experimental no funcionó por vía oral, y los animales puestos en contacto con los infectados no resultaron infectados (Wernike *et al.*, 2013). Además, no fue posible la reinfección de terneros previamente infectados. (Wernike *et al.*, 2013).

Los signos clínicos varían en función de la especie: las reses adultas han presentado una forma leve de enfermedad aguda durante la estación del vector, y se han observado malformaciones congénitas que afectan a más especies de rumiantes (hasta ahora: ganado vacuno, ovejas, cabras y bisontes). En algunas explotaciones

lecheras ovinas y bovinas también se ha observado diarrea (Beer *et al.*, 2012; Hoffmann *et al.*, 2012; van der Brom *et al.*, 2012; Wernike *et al.*, 2013).

Los signos se pueden resumir en el síndrome de la artrogriposis y la hidrocefalia (AG/HE): en animales con malformación y nacidos muertos (terneros, corderos, cabritos) los signos anatomopatológicos fueron artrogriposis-hidrocefalia, braquicefalia inferior, anquilosis, torticolis y escoliosis. La tasa exacta de malformación no se conoce y varía en función de la fase de la gestión en la que tenga lugar la infección. En varios países europeos se están llevando a cabo estudios epidemiológicos, inmunológicos y virológicos.

En estudios serológicos realizados en el ser humano no se han hallado indicios de que sea una enfermedad zoonótica (Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades, 2012; Reusken *et al.*, 2012).

#### 4. La enfermedad ovina de Nairobi

La enfermedad ovina de Nairobi (EON) está causada por un *Nairovirus* de la familia *Bunyaviridae* (Davies, 1988). Se caracteriza por una tasa de mortalidad de entre el 40% al 90%, y debería sospecharse siempre que los animales hayan sido trasladados recientemente desde un área libre de enfermedad a otra endémica. Los brotes también se producen por incursiones de garrapatas en áreas previamente libres, particularmente después de lluvias fuertes (Davies, 1997). Los signos clínicos son similares en las ovejas y las cabras, aunque hay diferencias en la susceptibilidad entre las distintas especies y cepas en lo que se refiere a su respuesta a la infección con el virus de la EON, siendo algunas más susceptibles que otras. Algunas crías autóctonas tienden a ser más susceptibles mientras que las foráneas pueden recuperarse después de una enfermedad prolongada. Las vacas y los animales de caza son refractarios a la infección por el virus de la EON (Zeller & Bouloy, 2000). El periodo de incubación para la enfermedad varía de 2 a 5 días cuando la temperatura alcanza 41–42°C. Hay una hiperventilación acompañada de una depresión severa, anorexia y aversión al movimiento. Los animales aparecen con la cabeza inclinada y muestran conjuntivitis y descarga nasal serosanguínea. Se pueden palpar algunos nódulos linfáticos superficiales, tales como el preescapular y/o el precrural. Normalmente sobreviene una diarrea a las 36–56 horas del comienzo de la reacción febril. Al principio es profusa, acuosa y fétida, más tarde hemorrágica y mucoides y acompañada por dolores cólicos y tenesmo rectal. El aborto es una secuela común de la infección. Es probable que el examen de los lugares preferidos de ataque de las garrapatas, tales como las orejas, la cabeza y el cuerpo, revele la presencia de la garrapata *Ixodid* de la familia *Rhipicephalus appendiculatus*.

Puede ocurrir la muerte en casos sobreagudos durante las 12 horas siguientes al inicio de la fiebre y en cualquier momento durante la reacción febril, mientras el animal está seriamente enfermo. En paralelo con un descenso de la temperatura en los 3–7 días siguientes, siguen produciéndose las muertes, asociadas con diarrea y deshidratación graves.

Las lesiones anatomopatológicas macroscópicas de la EON pueden ser engañosas, ya que la mayoría de las muertes probablemente suceden durante el periodo de viremia, etapa en la que los únicos signos presentes pueden ser linfadenitis con hemorragias petequiales y equimóticas en las superficies serosas del tracto digestivo, bazo, corazón y otros órganos. Ninguno de estos signos permite realizar un diagnóstico específico de la EON ni sospechar de la misma, ya que son idénticos a los de muchas otras enfermedades febriles de ovejas en áreas endémicas de la EON. Entre las enfermedades con las que puede confundirse la EON se incluye la fiebre del Valle del Rift, la peste de los pequeños rumiantes, la peste bovina (*rinderpest*), la salmonelosis y la coudriosis (*heartwater*). Al final del curso de la enfermedad se hace más patente una gastroenteritis hemorrágica con hemorragias en la mucosa del abomaso, especialmente a lo largo de los pliegues de la región de la válvula ileocecal, y más comúnmente en el colon y recto. En este último se aprecia frecuentemente acebrado. Normalmente, la vesícula biliar está agrandada y hemorrágica. Pueden observarse lesiones inflamatorias en el tracto genital femenino, si ha habido aborto. Sin embargo, en muchos animales muertos por la EON, puede que no se presente ninguna lesión gastroentérica, y raramente es posible hacer un diagnóstico provisional basándose en los signos post-mortem. Las lesiones histopatológicas comunes son degeneración miocárdica, nefritis y necrosis de la vesícula biliar.

Los signos post-mortem que siguen a la muerte en la fase inicial de la EON consisten en cambios inespecíficos de la congestión y las hemorragias petequiales y equimóticas en las superficies serosas, en los ganglios linfáticos, el bazo y otros órganos tales como riñones, pulmones e hígado. Tras la muerte en estadios posteriores de la enfermedad, se hacen evidentes los signos de una gastroenteritis hemorrágica, con ulceración del abomaso, duodeno, ciego y colon. El virus se transmite principalmente mediante garrapatas de la especie *Rhipicephalus appendiculatus*, y cualquier infestación con tales parásitos debería hacer sospechar de la presencia de la enfermedad. El virus de la EON también se puede transmitir por otras especies del género *Rhipicephalus* y por la garrapata *Amblyomma variegatum*.

El virus de la EON es un agente zoonótico aparentemente infrecuente en el medio natural, que causa una enfermedad leve similar a la gripe humana. La infección en laboratorios se ha asociado a fiebre y artralgia (Zeller & Bouloy, 2000).

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

### B.1. Identificación del agente

#### 1. El virus del Valle de Cache

El virus VVC no puede aislarse del neonato, pero sí se ha aislado de charcas de mosquitos y de la sangre de animales adultos virémicos. El aislamiento se ha realizado en cultivo de tejidos utilizando líneas celulares de riñón de hámster y de mono incluyendo riñón de hámster neonato (BHK), riñón de mono verde africano (Vero) y riñón de mono Rhesus adulto (LLC-MK2). El virus puede aislarse a partir de un animal febril empleando una suspensión al 10% de capa leucoplaquetaria en medio mínimo esencial (MEM) y el cultivo simultáneo con células Vero en medio MEM suplementado con suero fetal bovino al 2%.

El aislamiento vírico también se realiza comúnmente mediante inoculación intracerebral o intraperitoneal de ratones neonatos o destetados.

Muchos orthobunyavirus se han secuenciado debido a que son agentes patógenos de importancia médica asociados a casos de encefalitis en humanos, tanto en Norteamérica como en Sudamérica. Se ha aplicado la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección y vigilancia de charcas de mosquitos, en vez del tradicional aislamiento a partir de crías de ratón, y se ha descrito que la sensibilidad es de un mosquito positivo por cada grupo de 100, lo cual resulta indetectable por el método tradicional de titulación en placa utilizando cultivos celulares (Huang *et al.*, 2001).

Se han diseñado cebadores específicos de grupo y de virus y, empleando la PCR con transcripción inversa (RT-PCR), pueden distinguirse los serogrupos *Bunyamwera* (BUN) y *California* (CAL). Utilizando una RT-PCR combinada, los virus del serogrupo CAL y la mayoría de los del serogrupo BUN pueden distinguirse de otros miembros del género *Orthobunyavirus* (Kuno *et al.*, 1996; Moreli *et al.*, 2001). Se ha desarrollado recientemente una RT-PCR en tiempo real doble para el serogrupo CAL y para el VVC (Wang *et al.*, 2009) aunque todavía no está validada para aplicarla a la veterinaria.

#### 2. El virus Akabane

El diagnóstico de la infección raramente se realiza mediante el aislamiento del virus, sino que normalmente se lleva a cabo mediante serología y, en ocasiones, histopatología. Sin embargo, el virus se ha aislado a partir de animales virémicos centinela empleando suspensiones de capa leucoplaquetaria, a partir de grupos de vectores y, ocasionalmente, a partir de material fetal. Se ha descrito una RT-PCR para detectar el virus VAKA. Esto puede contribuir al diagnóstico, pero la diversidad del género *Orthobunyavirus* requiere una validación para confirmar la especificidad de la prueba porque hay evidencia de recombinaciones entre los Bunyavirus.

Para el aislamiento del virus en cultivo de tejidos, se emplean frecuentemente las líneas celulares Vero, BHK-21 y HmLu-1. Si se utilizan las células de mosquito C6/36 o de KC *Culicoides*, los cultivos se llevan hasta la fase estacionaria de crecimiento durante 7 días y se hace un nuevo pase del material utilizando un hámster o la línea celular Vero hasta que los cambios citopáticos sean visibles en los cultivos.

Los métodos empleados para la identificación del VAKA en los que se utilizan anticuerpos específicos incluyen la neutralización vírica (VN) y la inmunofluorescencia (FA) (Blacksell *et al.*, 1997; Gard *et al.*, 1988). Se ha descrito también en terneros recién nacidos la detección del antígeno en material fijado con formalina mediante la tinción del material fetal bovino y ovino basada en peroxidasa (Noda *et al.*, 2001). Se han desarrollado también métodos de detección de ácidos nucleicos para diferenciar los virus Aino y Akabane empleando una prueba de RT-PCR anidada seguida de la digestión de enzimas de restricción para diferenciar los virus Akabane Aino, Peaton y Tinaroo en el serogrupo (Akashi *et al.*, 1999). También se ha descrito una RT-PCR múltiple en tiempo real en la que se utilizan sondas Taq Man, de la que se afirma que es capaz de identificar los virus Akabane y Aino de forma precisa y fiable (Stram *et al.*, 2004). Una alternativa a la RT-PCR para la detección del VAKA es la amplificación isotérmica mediada por bucle con transcripción inversa, que puede detectar apenas cinco DICT<sub>50</sub> (dosis que resultan infectivas en el 50% del cultivo tisular) de virus por ml (Qiao *et al.*, 2013).

#### 3. El virus Schmallenberg

El VSB se puede detectar mediante la RT-PCR en tiempo real (Bilk *et al.*, 2012). También existen varios kits de PCR comerciales. El virus infeccioso se puede aislar en cultivo celular, para lo cual se han empleado células infectadas (KC), células de hámster (BHK) y células de riñón de mono (Vero). Las muestras para la detección o aislamiento del virus deben transportarse refrigeradas o congeladas. El suero o sangre en EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) suelen ser las muestras empleadas para detectar una infección aguda en animales vivos durante el corto periodo de viremia (2-6 días). Si se trata de terneros, corderos o cabritos nacidos muertos

o con malformaciones, el ARN vírico se puede detectar en muestras de tejido de encéfalo (cerebro y tronco encefálico) y en líquido amniótico, y en el caso de los nacidos vivos, en el líquido amniótico, la placenta o el meconio. No obstante, el aislamiento del virus es difícil, y en los estudios en los que se ha intentado solo ha funcionado parcialmente.

En el caso de ternero, corderos o cabritos nacidos muertos o con malformaciones, el diagnóstico también puede realizarse mediante histopatología con muestras de sistema nervioso central fijado, incluida la médula espinal. Las lesiones son características de la hidrocefalia, la hipoplasia del sistema nervioso central, la porencefalia y el edema subcutáneo (terneros). Sin embargo, la sensibilidad es menor que la de la RT-PCR.

Dado que los signos son inespecíficos, debe realizarse un diagnóstico diferencial. En el caso de la infección aguda de animales adultos, deben tenerse en cuenta todas las enfermedades que causen fiebre alta, diarrea o reducción de la producción de leche. En el caso de malformación de terneros, corderos o cabritos, deben tenerse en cuenta otros orthobunyavirus, el virus de la lengua azul, pestivirus, factores genéticos y sustancias tóxicas.

#### 4. El virus de la enfermedad ovina de Nairobi

El virus de la EON se puede aislar a partir de material recogido de muestras de campo mediante el uso de animales de laboratorio o cultivos celulares (Davies *et al.*, 1977a). Se deben adoptar medidas de seguridad contra las posibles infecciones por aerosoles cuando se trabaja con este agente. Sangre no coagulada, ganglios linfáticos mesentéricos y tejido procedente del bazo mantenido en paquetes con gel congelado son las muestras óptimas que deben recogerse a partir de animales febriles o muertos. Como inóculo se puede utilizar directamente plasma, y los ganglios linfáticos y el bazo deben homogeneizarse hasta preparar una suspensión al 10% (p/v) en un medio de transporte. Este medio puede ser medio Hanks con hidrolizado de lactoalbúmina al 0,5% o seroalbúmina bovina al 0,75%, conteniendo penicilina (500 Unidades Internacionales/ml), estreptomycin sulfato (500 µg/ml), y micostatina (50 unidades/ml) o fungizona (2,5 µg/ml).

La línea celular BHK-21-C13 es especialmente valiosa para aislar el virus en cultivo celular, y también se ha empleado la línea celular Vero (Shepherd *et al.*, 1978) y cultivos primarios y secundarios de riñón de hámster o de cordero. La mayoría de las cepas del virus de la EON produce un efecto citopático (ECP) en el primer pase empleando células BHK; hay otras que producen un ECP más evidente solo después de una subinoculación. Con células de testículo o riñón de cordero no siempre se obtiene ECP, pero puede conseguirse tras múltiples pases. Se deben utilizar cultivos en tubo tanto con como sin cubreobjetos, o si se emplean frascos de plástico para el aislamiento, deben prepararse cultivos en portas con micropocillos. Se deben inocular aproximadamente 0,2 ml y se deja transcurrir un periodo de 1–2 horas para permitir la adsorción. El ECP se aprecia en cultivos en frascos rotatorios como focos de células redondeadas granulares después de 24–48 horas cuando se trata de células BHK, y después de 24–48 horas más en otros tipos de células. El ECP no es específico del virus de la EON, el cual se identifica en cultivos sobre cubreobjetos por inmunofluorescencia o mediante tinción con hematoxilina y eosina. Este último método revela inclusiones intracitoplasmáticas eosinófilas pleomórficas peculiares en forma de huso; otras inclusiones son bipolares, o rodean el núcleo.

El virus puede identificarse específicamente por inmunofluorescencia, que puede ser positiva en tan solo 24–48 horas después de la inoculación, cuando todavía no es evidente ningún ECP. Los conjugados para la inmunofluorescencia pueden prepararse a partir de fluidos ascíticos de ratón hiperinmune, y a partir de antisueros de conejo u oveja inmunes mediante métodos estándar. Puede producirse alguna fluorescencia cruzada con otros *Nairovirus* a bajas diluciones del conjugado, pero estos virus normalmente no se asocian con enfermedades de ovejas o cabras.

La prueba de inmunodifusión en gel de agar (AGID) puede ser una valiosa herramienta de diagnóstico primario para la detección del antígeno de la EON en tejidos. Esta prueba se puede realizar en laboratorios sin medios adecuados para el cultivo de tejidos y en laboratorios de investigación de campo. Los tejidos de elección para utilizar en estas pruebas son de bazo y de ganglios linfáticos mesentéricos. Se homogenizan alícuotas de 0,5–1 g con arena estéril en un mortero o en un homogeneizador hasta conseguir suspensiones al 10–20% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) o solución salina. La suspensión se centrifuga 10–15 minutos a aproximadamente 1.000 **g** y el sobrenadante se emplea en la prueba. Esta prueba también puede utilizarse para la identificación del antígeno vírico de la EON en cerebro de ratón recogido a partir de ratones infectados experimentalmente (véase más arriba).

El suero hiperinmune de conejo contra la EON para ser utilizado en la AGID puede prepararse mediante la inoculación repetida en cerebro de ratón infectado por la EON. Se prepara una suspensión de cerebro de ratón al 2–5 % (p/v) como se ha indicado anteriormente y se centrifuga a 3–5.000 **g** durante 15 minutos. Entonces se mezclan alícuotas con igual volumen del adyuvante. Se pueden emplear distintas pautas de inoculación pero pueden utilizarse volúmenes de 1-ml por vía subcutánea y/o intramuscular a intervalos de 7-días durante 3–5 semanas, o en puntos de inoculación múltiple utilizando volúmenes de 0,1-ml durante un periodo similar. El suero se debe recoger 5–7 días después de la última inyección y se debe almacenar en alícuotas a –20°C.

Pueden utilizarse cultivos de tejido infectado como antígenos para la identificación del virus en las pruebas de fijación del complemento (CF).

A fin de identificar el virus mediante la técnica de enzimoimmunoanálisis (ELISA), se puede preparar el antígeno a partir de un cultivo en frasco del tejido infectado. Las células se recogen con una pipeta Pasteur en el momento en el que aproximadamente el 20% de la monocapa de células muestre ECP. Se precipitan y lavan tres veces en tampón borato salino, pH 9. Entonces las células se lisan y solubilizan con SDS (dodecilsulfato sódico) y Triton X100 al 1%, se diluyen aproximadamente 1/5 en tampón borato salino y se sonicán; de esta forma se consigue un antígeno para la técnica ELISA. El antígeno control negativo se prepara de la misma forma pero a partir de células no infectadas. Los antígenos se adsorben directamente a las placas ELISA y la prueba se lleva a cabo con suero normal y suero inmune a la EON enfrentándolos a ambos tipos de antígeno.

Se ha descrito una RT-PCR en tiempo real específica de la EON que se ha observado que es más sensible que el aislamiento del virus (Bin Tarif *et al.*, 2012). Sin embargo, todavía no está completamente validada para su uso como herramienta de diagnóstico.

## B2. Pruebas serológicas

Pueden ser pruebas de inhibición de la hemoaglutinación (HI), CF, VN y ELISA, pero la HI y la CF casi nunca se utilizan.

### 1. El virus del Valle de Cache

#### 1.1. Prueba de neutralización vírica

La VN para el VVC puede realizarse mediante el método de neutralización por reducción de placas, pero actualmente se emplea con más frecuencia el método de inhibición del ECP utilizando células Vero en placas de microtitulación (Chung *et al.*, 1990).

##### 1.1.1. Procedimiento analítico

- i) El suero problema se inactiva a 56°C durante 30 minutos en un baño con agua.
- ii) Se realizan diluciones seriadas al doble del suero en MEM desde la dilución 1/2 a la 1/16 y se incuban a 37°C durante 60 minutos con un volumen igual de 100 DICT<sub>50</sub> (dosis infectiva al 50% en cultivo tisular) por ml de virus. Los controles estándar se preparan de manera similar.
- iii) Se vierte el medio en una placa de microtitulación con 96 pocillos de fondo plano para cultivo de tejidos que contengan una monocapa de células Vero de 24-horas.
- iv) Se añaden las mezclas suero/virus a la placa, 50 µl en cada pocillo, utilizando tres pocillos por dilución.
- v) Para titular de nuevo el virus usado en la prueba se realizan tres diluciones a la décima utilizando 50 µl por pocillo y cuatro pocillos por dilución.
- vi) Se cubren las placas y se vuelven a incubar durante 60 minutos a 37°C.
- vii) Se añaden 50 µl de medio de mantenimiento MEM a cada pocillo.
- viii) Se incuban las placas a 37°C durante 6 días en una incubadora de CO<sub>2</sub> con atmósfera humidificada.
- ix) Después del examen microscópico de las placas, se evalúa el ECP y se determinan los puntos finales a 50%.
- x) El control de virus debe dar un valor de 100 DICT<sub>50</sub> y no debe haber neutralización con el suero control negativo a las diluciones menores ensayadas. El control positivo debe dar un título dentro del rango esperado de la media predeterminada.

#### 1.2. Enzimoimmunoanálisis

Para las determinaciones serológicas del VVC se utiliza una técnica ELISA modificada y basada en una descrita por Meegan *et al.* para la fiebre del Valle del Rift (1987). Las modificaciones incluyen una dilución 1/400 de fluido ascítico de ratón para cubrir las placas, seguido de una dilución 1/25 de antígeno de cerebro de ratón en sacarosa/acetona en un formato de ELISA tipo sándwich. El diluyente empleado es PBS con Tween 20 al 0,5%, suero equino al 5% y 500 µg de sulfato dextrano por ml. Se



utiliza un sistema de detección conjugado a peroxidasa de rábano y el sustrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-[3-etil-benzotiazolina]-6-sulfónico) (Meegan *et al.*, 1987).

### 1.3. Otras pruebas

No todos los miembros del grupo Bunyamwera producen hemoaglutininas, pero se ha descrito una prueba HI para el VVC utilizando de antígeno cerebro de ratón lactante en sacarosa/acetona y empleando eritrocitos de ganso a pH 6,2. Se dice que la prueba carece de sensibilidad si se compara con una prueba VN, proporcionando solo el 50% de detección de anticuerpos. La prueba CF se utiliza poco debido a la extensa reactividad cruzada dentro del grupo Bunyamwera.

## 2. El virus Akabane

### 2.1. Prueba de inhibición de la hemoaglutinación

La prueba de HI es una modificación de la de Clarke & Casals 1958 (1958) y se consigue una mejor hemoaglutinación con una mayor molaridad de NaCl. La prueba también depende del valor de pH. Los sueros se pretratan con caolín o acetona y después se inactivan por calor a 56°C durante 30 minutos. La prueba se realiza utilizando cuatro unidades de antígeno de cerebro de ratón extraído en sacarosa/acetona y eritrocitos al 0,3% en tampón borato, pH 9 (Goto *et al.*, 1978).

### 2.2. Prueba de la neutralización vírica

Las pruebas NV se han descrito utilizando células HmLu-1 en cultivos en tubo o células Vero o BHK en placas de microtitulación con 96 pocillos de fondo plano (Cybinski *et al.*, 1978; Da Costa Mendes, 1984). Se han descrito dos técnicas, una con un periodo de incubación del suero/virus de 1 hora y otra con una incubación a lo largo de la noche antes de añadir las células.

#### 2.2.1. Procedimiento analítico

- i) Se inactiva el suero problema a 56°C durante 30 minutos en un baño con agua.
- ii) Se realizan diluciones seriadas al doble del suero en medio de Eagle desde la dilución 1/2 a la 1/16 en una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano empleando pocillos por duplicado y 25 µl por pocillo. Los controles estándar se preparan de manera similar.
- iii) En cada pocillo se añaden 25 µl de virus en medio de Eagle diluido hasta conseguir 200 DICT<sub>50</sub> por cada 50 µl.
- iv) Se cubren y se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora.
- v) Se incluye un control para titular de nuevo el virus por triplicado, preparando tres diluciones a la décima y empleando 25 µl por pocillo.
- vi) Se añaden 100 µl por pocillo de suspensión celular medio de Eagle con suero al 2%, a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml.
- vii) Las placas se incuban a 34–37°C durante 5 días en una incubadora de CO<sub>2</sub> con atmósfera humidificada.
- viii) Después del examen al microscopio de las placas, el título se calcula como el inverso de la mayor dilución que inhibe completamente el ECP.
- ix) Los controles del virus y del suero deben dar los resultados esperados.

Cuando se realice la incubación durante toda la noche, se preparan por duplicado diluciones seriadas al doble del suero inactivado que se mezclarán con 100 DICC<sub>50</sub> del virus utilizando volúmenes de 100 µl en cada caso. Después de una incubación de 1 hora a 37°C y durante la noche a 4°C, se añaden 50 µl de suspensión celular a la prueba. La placa se examina a los 3 y 5 días de la incubación a 37°C para detectar ECP.

### 2.3. Enzimoimmunoanálisis

Se han descrito varios ELISA para el VAKA, que emplean IgG e IgM. El antígeno de revestimiento es  $10^6$  DICT<sub>50</sub> por ml de virus crecido en células HmLu-1 diluidas en tampón carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. El medio de lavado es PBS conteniendo Tween 20 y fosfatasa alcalina. Se utilizan anticuerpos generados en conejo anti IgG e IgM bovina conjugados (Ungar-Waron *et al.*, 1989).

Se ha descrito un ELISA similar en el que se utilizan anticuerpos anti Ig bovina generados en conejo y conjugados a peroxidasa de rábano.

También se ha elaborado un ELISA de competición con un 98% de especificidad (Tsuda *et al.*, 2004) y existe en formato de kit comercial.

## 3. Virus Schmallenberg

Las pruebas serológicas se llevan a cabo con muestras de suero o de plasma. Actualmente, las más utilizadas son i) el ELISA con reactivos internos o con los distintos kits (indirecto o de competición) que ahora comercializan varias compañías; ii) la prueba de la inmunofluorescencia indirecta; y iii) la VN.

En una primera comparación entre laboratorios de todo el mundo, la VN fue más sensible que la mayoría de los sistemas ELISA utilizados (van der Poel *et al.*, 2014).

### 3.1. Enzimoimmunoanálisis

Se han desarrollado varios tipos de ELISA (Breard *et al.*, 2013; van der Heijden *et al.*, 2013), y también los comercializan varias compañías.

Estos sistemas se clasifican en ELISA indirectos basados en proteína N recombinante o preparaciones de virus entero, y ELISA de competición en los que se utilizan anticuerpos monoclonales específicos de nucleoproteína.

### 3.2. Prueba de la neutralización del virus

Se han descrito pruebas de VN con células Vero o BHK en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos (Loeffen *et al.*, 2012; Mansfield *et al.*, 2013).

El siguiente protocolo se basa en Wernike *et al.* (2013). La prueba de la neutralización se lleva a cabo de forma rutinaria con placas de microtitulación de 96 pocillos empleando medio de cultivo celular con antibióticos. Excepcionalmente, si no se dispone de suero, la prueba puede realizarse con plasma, pero en este caso no puede evaluarse de forma efectiva diluciones inferiores a 1/20.

#### 3.2.1. Procedimiento analítico

- i) Se inactivan los sueros problema a 56°C durante 30 minutos en un baño de agua.
- ii) Se preparan diluciones seriadas a la mitad con los sueros y el medio, partiendo de 1/5 y hasta 1/640, en una placa de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos empleando pocillos por duplicado o cuadruplicado y 50 µl por pocillo.

Se cargan los pocillos de la primera fila con 80 µl, y los pocillos de las otras filas con 50 µl de medio de cultivo. Se añaden 20 µl de muestra de suero a la primera fila. Se toman 50 µl del primer paso de dilución (dilución a 1/5), se añaden a la siguiente fila, se mezclan, y se continúa con la serie de diluciones. Se desechan los últimos 50 µl. Cada pocillo contiene ahora 50 µl de una dilución de suero y medio.

Los controles patrón (sueros de referencia positivos y negativos) se preparan de un modo similar.

- iii) Se añaden 50 µl por pocillo de una preparación de virus con DICT<sub>50</sub>/50 µl (2000 DICT<sub>50</sub>/ml). La cantidad requerida de virus problema (unos 5 ml por placa de microtitulación) debe prepararse en un lote.

Además de los sueros control positivo y negativo, debe prepararse un control celular (100 µl de medio de cultivo sin suero y virus), así como un suero control sin virus (dilución 1/5).

El virus problema debe someterse a una titulación por retroceso en cada prueba. La dilución de virus empleada en la prueba se diluye en pasos de  $\log_2$  por duplicado o cuadruplicado, empezando con 1/10 y llegando hasta 1/1280. Los pocillos se llenan previamente con 180  $\mu$ l de medio de cultivo, y se añaden 20  $\mu$ l de suspensión de virus problema a una dilución de 1/10, y finalmente se se diluyen.

- iv) Se cubre e incuba la placa de microtitulación durante 2 horas a 37°C en un medio húmedo en una cabina de CO<sub>2</sub>. Durante este periodo de tiempo, tiene lugar el proceso de neutralización.
- v) Tras el periodo de incubación, se añaden 100  $\mu$ l de la suspensión celular respectiva a cada pocillo. Se ajusta la densidad, de tal modo que pasadas 24 horas aparezca una capa de células confluyente. La placa de microtitulación permanece en un medio húmedo en la cabina de CO<sub>2</sub> para la incubación.
- vi) Se incuban las placas a 34-37°C durante 3-4 días en una incubadora de CO<sub>2</sub>.
- vii) La evaluación se lleva a cabo valorando el efecto citopático. La lectura final se realiza los días 3 o 4 tras la preparación de la prueba.

La prueba es válida si la titulación por retroceso oscila entre 30 y 3000 DICT<sub>50</sub>, y el suero control positivo presenta el título indicado ( $\pm$  un paso de  $\log_2$ ).

El título de anticuerpos se calcula como la ND<sub>50</sub> según Behrens y Kärber.

Título de neutralización =  $V-d \times (S-0,5)$

V: lg de la primera dilución del suero 100% positiva

d: lg del factor de dilución (por norma, 0,3)

S: suma de los resultados positivos entre el 0 y el 100%/número de resultados positivos por dilución

## 4. La enfermedad ovina de Nairobi

### 4.1. Prueba de la inmunofluorescencia indirecta

La prueba de inmunofluorescencia indirecta (FA) es la prueba idónea para ser utilizada con los miembros del serogrupo *Nairovirus*. Sin embargo, hay algunas reacciones cruzadas, particularmente con el virus *Dugbe* y también con otros miembros del grupo, tales como el virus de la fiebre hemorrágica del Congo-Crimea y el virus de Kupe (Davies *et al.*, 1978). Los títulos de anticuerpos de la EON por este método oscilan entre 1/640 y 1/10.240, y estos títulos no se obtienen con suero inmune frente a otros miembros del grupo (Davies *et al.*, 1976).

Este método se ha utilizado en estudios epidemiológicos y para averiguar la respuesta a vacunas experimentales. No parece que existan diferencias serológicas entre los 40–50 aislamientos que han sido examinados. La cepa I-34 de EON<sup>3</sup> es el virus habitualmente utilizado para preparar el antígeno, y ha sido adaptado a crecer en células BHK-21-C13, después de una serie de pases.

Para la prueba el antígeno vírico sobre el sustrato de elección puede crecerse en cubreobjetos, en portas multipocillo, en portas cubiertos de Teflón o en placas de microtitulación. A continuación se describe un método que emplea portas cubiertos de Teflón.

#### 4.1.1. Preparación de los portas con antígeno

- i) Se lavan y esterilizan unos portas cubiertos de Teflón. Esto se realiza brevemente en caliente con un detergente que se usa para material de vidrio en los laboratorios de cultivo de tejidos; posteriormente durante 30 minutos se enjuagan tres veces bajo agua corriente, seguido en cada ocasión por enjuagues similares en agua destilada/desionizada. A continuación se sumergen en alcohol al 70% durante 10 minutos, se sacan con unas pinzas estériles y se envuelven en papel a prueba de grasa. Entonces los portas podrán

3 La cepa I-34 era cepa virulenta de la EON procedente de Kenia que se utilizó ampliamente como cepa de referencia en el Laboratorio Kabete – Instituto de Investigaciones Agrícolas de Kenia, P.O. Box 14733, Nairobi, Kenia.

esterilizarse y para ello se recomienda utilizar un microondas aplicando dos ciclos de 5 minutos cada uno.

- ii) Se colocan estos portas en placas estériles empleando pinzas estériles; es preferible un tipo cuadrado de poliestireno que la variedad redonda.
- iii) Se mezcla una suspensión de células BHK conteniendo aproximadamente 25.000 células/ml en medio de crecimiento para BHK (normalmente es medio de Eagle para las células BHK), y se añaden por cada mililitro 1.000 DICC<sub>50</sub> de la cepa I-34 de la EON. Se mezcla con la pipeta. Se preparan algunos portas no infectados como control negativo.
- iv) Se añaden las células infectadas en volúmenes de 50 µl (para el tamaño de pocillo 12) o el volumen apropiado al tamaño de los pocillos de Teflón. Se vuelven a colocar las tapas en las placas y se colocan en una incubadora de CO<sub>2</sub> con atmósfera humidificada o en una cámara de anaerobios.
- v) Se deja toda la noche para permitir que se desarrolle la monocapa. Posteriormente se sacan las placas de la incubadora y se introducen en una cabina de flujo laminar, y se añade medio de mantenimiento con una pipeta cubriendo los portas hasta una profundidad de 2–3 mm. Se vuelven a introducir en la incubadora.
- vi) Se recogen los portas con antígeno justo cuando comienzan a detectarse focos de ECP. Esto se producirá en 36–56 horas (una determinación más precisa del tiempo óptimo de recogida puede hacerse fijando y tiñendo un porta después de 24, 36 y 48 horas).
- vii) Los portas se lavan tres veces con PBS y se secan. A continuación se fijan con calor seco (mínimo 80°C) o con acetona enfriada en hielo durante 10 minutos. Los portas se envuelven y se pueden conservar a 4°C durante 2–3 meses, o a –20°C durante 1–2 años. Los portas conservados a –20°C deben ser mantenidos a 4°C durante toda la noche previamente a su uso.

Se pueden seguir procedimientos similares para preparar el antígeno en cubreobjetos o en portas de cultivo multipocillo. Sin embargo, cuando se emplean placas multipocillo para cultivo de tejidos Nunc, la fijación debe realizarse con acetona al 75%.

#### 4.1.2. Procedimiento analítico

- i) Los portas se hidratan añadiendo una gota de PBS a los pocillos con una pipeta Pasteur. El número de portas debe concordar con el número de sueros a ensayar. Se incluyen en las series sueros control positivo y negativo con cultivos de células infectadas y no infectadas.
- ii) Se elimina el PBS y se añaden las diluciones 1/80–1/2.560 del suero de una manera predeterminada en los pocillos 1 a 6. Es preferible duplicar cada dilución en el mismo porta.
- iii) Se disponen los portas en placas y se mantienen a 37°C en una incubadora con ambiente húmedo durante 40 minutos.
- iv) Se lavan los portas colocados en gradillas realizando tres cambios de PBS, 5 minutos por lavado.
- v) Se añade el conjugado antiespecie (normalmente anti-oveja o anti-cabra) conjugado a fluoresceína a una dilución de trabajo predeterminada; se puede añadir una gota a cada pocillo con una pipeta Pasteur u otro tipo de pipeta.
- vi) Se incuban como antes durante 30 minutos.
- vii) Los portas se lavan tres veces con PBS y se secan.
- viii) Los portas se examinan al microscopio de fluorescencia. El antígeno vírico de la EON se encuentra en el citoplasma celular, y se verán focos de agregados de células BHK fluorescentes. El antígeno se apreciará principalmente en finas partículas fluorescentes, pero pueden producirse grandes acúmulos de antígeno de forma irregular, a menudo rodeando al núcleo o pueden observarse masas en forma de huso ocupando el citoplasma hasta el polo de las células. Estas partículas no se verán con sueros negativos o en los cultivos control no inoculados.
- ix) Los sueros que muestren esta fluorescencia a las diluciones 1/640 o 1/1.280 serán indicativos de infección reciente por el virus de la EON (Davies *et al.*, 1976).

#### 4.2. Otras pruebas

Las pruebas CF se complican por la marcada actividad anticomplementaria de muchos sueros ovinos.

Las AGID se han utilizado con éxito empleando antígenos crudos preparados a partir de tejido de oveja infectada, sobrenadantes de cultivo de tejidos o material de cerebro de ratón. Los sueros hiperinmunes se pueden preparar en ovejas, ratones o conejos para ser utilizados en la prueba, empleando bazo infectado procedente de ovejas muertas por la EON como fuente antigénica para la inmunización.

Se ha descrito una técnica ELISA que utiliza un antígeno de cultivo de tejidos parcialmente purificado para analizar sueros y que es adecuado para utilizar en determinaciones serológicas. El FAT indirecto, sin embargo, se emplea para chequear resultados dudosos (Munz *et al.*, 1984).

Se han desarrollado anticuerpos monoclonales para los antígenos de la cepa I-34 del virus de la EON y se han evaluado para su aplicación como reactivos de diagnóstico.

Se han sintetizado sondas de ARN a partir de los segmentos S (pequeños, *small*) y M (medios, *medium*) del genoma del virus Dugbe y se han utilizado para demostrar que el serogrupo EON del género *Nairovirus* está más estrechamente relacionado al serogrupo de la fiebre hemorrágica del Congo-Crimea que cualquier otro de los restantes serogrupos (Marriott *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1992). Estas sondas también son potenciales herramientas de aplicación diagnóstica.

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

### 1. El virus del Valle de Cache

Debido a la naturaleza espontánea de los brotes de la enfermedad, no se ha desarrollado ninguna vacuna.

### 2. El virus Akabane

La principal epizootia de la enfermedad de Akabane solo se ha descrito en Japón y Australia, aunque a intervalos irregulares, no obstante la vacunación se observa que tiene utilidad para prevenir pérdidas fetales.

Se utiliza una vacuna inactivada para inmunizar vacas y cabras. Se han utilizado preparaciones intramusculares inactivadas con formalina o bien con beta-propiolactona, con un gel adyuvante de fosfato de aluminio. Se dan dos dosis de 3 ml con un intervalo de 4 semanas justo antes de la monta, y se recomiendan dosis de refuerzo anuales. Es una vacuna segura para ser utilizada en hembras gestantes. En los ensayos de campo el 88% de los animales desarrollan un alto número de anticuerpos NV después de la primera inoculación y hay una respuesta del 100% después de la segunda dosis (Kurogi *et al.*, 1978). Se ha observado un nivel alto de eficacia tras el desafío natural en condiciones de campo.

En Japón se comercializa una vacuna viva contra el virus Akabane. Se administra subcutáneamente una dosis de 1 ml a las vacas antes de que los vectores de los artrópodos hematófagos se vuelvan activos. Se inocularon vacas gestantes y terneras por vía subcutánea, intramuscular e intracerebral; no se apreció leucopenia, viremia o pirexia y se produjo una buena respuesta de anticuerpos de NV. Una vacuna viva del virus Akabane, segura en vacas, se ha probado en ovejas gestantes. Durante los ensayos, algunas ovejas se hicieron virémicas y se encontró el virus en los órganos de diversos fetos. Aunque no se produjeron deformaciones fetales, la vacuna se considera inadecuada para ser usada en ovejas.

### 3. Virus Aino

Se han desarrollado vacunas de virus Aino, y se comercializan en Japón. También se ha probado una vacuna trivalente inactivada (con los virus Aino, Akabane y Chuzan) que se ha observado que funciona en ganado bovino (Kin *et al.*, 2011).

### 4. Virus Schmallerberg

Se dispone de vacunas inactivadas contra el VSB que cuentan con licencia en algunos países de Europa.

## 5. La enfermedad ovina de Nairobi

Las investigaciones epidemiológicas han demostrado que, en estado de estabilidad enzoótica, no se encuentran problemas con la EON. La enfermedad surge de los movimientos de los animales desde áreas libres a áreas endémicas, y puede evitarse cuando tales áreas están bien definidas. Los cambios medioambientales que permitan la propagación de la garrapata que actúa de vector contribuirán a ampliar dichas áreas.

Se han preparado vacunas experimentales para tales situaciones. La vacuna consiste en el virus atenuado por 35 pases en ratones adultos, pero estas vacunas pueden producir reacciones severas en algunas crías de oveja, y no se consideran seguras para uso general. En Entebbe se preparó una vacuna similar mediante pases posteriores en cerebro de ratón, pero después no ha sido desarrollada para su uso en el medio natural de Uganda ni en ningún otro sitio.

Una cepa del virus de la EON adaptada al cultivo de tejidos se ha crecido hasta alcanzar un título elevado en cultivos crecidos en frascos rotatorios. Cuando se precipita con metanol, se inactiva y administra con un adyuvante, se observa que proporciona una buena protección después de dos inoculaciones a intervalos de 14 días. Ninguna de estas vacunas se produce rutinariamente debido a la escasa demanda para uso de campo (Davies *et al.*, 1974; 1977b).

## BIBLIOGRAFÍA

AKASHI H., ONUMA S., NAGANO H., OHTA M. & FUKUTOMI T. (1999). Detection and differentiation of Aino and Akabane Simbu serogroup bunyaviruses by nested polymerase chain reaction. *Arch. Virol.*, **144**, 2101–2109.

BRÉARD E. LARA E., COMTET L., VIAROUGE C., DOCEUL V., DESPRAT A., VITOUR D., POZZI N., CAY A.B., DE REGGE N., POURQUIER P., SCHIRRMIEER J., HOFFMANN B., BEER M., SAILLEAU C. & ZIENTRA S. (2013). Validation of a commercially available indirect ELISA using a nucleocapside recombinant protein for detection of Schmallenberg virus antibodies. *PLoS One*, **8** (1):e53446. doi: 10.1371/journal.pone.0053446. Epub 2013 Jan 15.

BEER M., CONRATHS F.J., VAN DER POEL W.H. (2012). ‘Schmallenberg virus’ – a novel orthobunyavirus emerging in Europe. *Epidemiol. Infect.*, **141**, 1–8.

BILK S., SCHULZE C., FISCHER M., BEER M., HLINAK A. & HOFFMANN B. (2012). Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns. *Vet. Microbiol.*, **159**, 236–238.

BIN TARIF A., LASECKA L., HOLZER B. & BARON M.D. (2012). Ganjam virus/Nairobi sheep disease virus induces a pro-inflammatory response in infected sheep. *Vet. Res.*, **43**, 71.

BLACKMORE C.G. & GRIMSTAD P.R. (1998). Cache Valley and Potosi viruses (*Bunyaviridae*) in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) experimental infections and antibody prevalence in natural populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **59**, 704–709.

BLACKSELL S.D., LUNT R.A. & WHITE J.R. (1997). Rapid identification of Australian bunyavirus isolates belonging to the Simbu serogroup using indirect ELISA formats. *J. Virol. Methods*, **66**, 123–133.

CALISHER C.H., FRANCO D.B., SMITH G.C., MUTH D.J., LAZUICK T.S., KARABATSOS N., JAKOB W.L. & McLEAN R.G. (1986). Distribution of Bunyamwera serogroup viruses in North America, 1956–1984. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**, 429–443.

CAMPBELL G., MATA CZYNSKI J.D., REISDORF E.S., POWELL J.W., MARTIN D.A., LAMBERT A.J., HAUPT T.E., DAVIS J.P. & LANCIOTTI R.S. (2006). Second human case of Cache Valley virus disease. *Emerg. Infect. Dis.*, **12**, 854–856.

CHUNG S.I., LIVINGSTON C.W. JR, EDWARDS J.F., CRANDELL R.W., SHOPE R.E., SHELTON M.J. & COLLISON E.W. (1990). Evidence that Cache Valley virus induces congenital malformations in sheep. *Vet. Microbiol.*, **21**, 297–307.

CHUNG S.I., LIVINGSTON C.W. JR, EDWARDS J.F., GAUER B.B. & COLLISON E.W. (1990). Congenital malformations in sheep resulting from *in utero* inoculation of Cache Valley virus. *Am. J. Vet. Res.*, **51**, 1645–1648.

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

CRANDELL R.A., LIVINGSTON C.W. JR & SHELTON M.J. (1989). Laboratory investigation of a naturally occurring outbreak of arthrogryposis-hydrancephaly in Texas sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **1**, 62–65.

- CYBINSKI D.H., ST GEORGE T.D. & PAULL N.I. (1978). Antibodies to Akabane virus in Australia. *Aust. Vet. J.*, **54**, 1–3.
- DA COSTA MENDES V.M. (1984). The isolation and importance of Simbu group viruses in South Africa. Thesis for M. Med. Vet (Vir.) University of Pretoria, South Africa.
- DAVIES F.G. (1988). Nairobi sheep disease. *In: The Ecology of Arboviruses*, Vol. 3, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 191–203.
- DAVIES F.G. (1997). Nairobi sheep disease. *Parasitologia*, **39**, 95–98.
- DAVIES F.G., CASALS J., JESSETT D.M. & OCHIENG P. (1978). The serological relationships of Nairobi sheep disease virus. *J. Comp. Pathol.*, **88**, 519–523.
- DAVIES F.G., JESSETT D.M. & OTIENO S. (1976). The antibody response of sheep following infection with Nairobi sheep disease virus. *J. Comp. Pathol.*, **86**, 497–502.
- DAVIES F.G., MUNGAI J. & SHAW T. (1974). A Nairobi sheep disease vaccine. *Vet. Rec.*, **94**, 128.
- DAVIES F.G., MUNGAI J. & TAYLOR M. (1977a). The laboratory diagnosis of Nairobi sheep disease. *Trop. Anim. Health Prod.*, **9**, 75–80.
- DAVIES F.G., OTIENO S. & JESSETT D.M. (1977b). The antibody response in sheep vaccinated with experimental Nairobi sheep disease vaccines. *Trop. Anim. Health Prod.*, **9**, 181–183.
- EDWARDS J.F., KARABATSOS N., COLLISON E.W. & DE LA CONCHA BERMEJILLO A. (1997). Ovine fetal malformations induced by *in utero* inoculation with Main Drain, San Angelo and LaCrosse viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **56**, 171–176.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (2012). Joint ECDC/RIVM/RKI rapid risk assessment. New *Orthobunyavirus* isolated from cattle and small livestock – potential implications for human health. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/TER-Joint-ECDC-RIVM-RKI-Rapid-Risk-Assessment-Schmallenberg-virus-May-2012.pdf>
- FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (EDS) (2005). Bunyviridae family. *In: 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, 1162 pp. Elsevier Publication Date: 27 May 2005 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/lctv/index.htm>.
- GARD G.P., WEIR R.P. & WALSH S.J. (1988). Arboviruses recovered from sentinel cattle using several virus isolation methods. *Vet. Microbiol.*, **18**, 119–125.
- GOLLER K.V., HÖPER D., SCHIRRMIEER H., METTENLEITER T.C. & BEER M. (2012). Schmallenberg virus as possible ancestor of shamonda virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **18**, 1644–1666.
- GOTO Y., INABA Y., MIURA Y., KUROGI H., TAKAHASHI E., SATO K., OMORI T., HANAKI T., SAZAWA H. & MATUMOTO M. (1978). Hamagglutination-inhibition test applied to the study of Akabane virus infection in domestic animals. *Vet. Microbiol.*, **3**, 89–99.
- HOFFMANN B., SCHEUCH M., HÖPER D., JUNGBLUT R., HOLSTEG M., SCHIRRMIEER H., ESCHBAUMER M., GOLLER K.V., WERNIKE K., FISCHER M., BREITHAUP T., METTENLEITER T.C. & BEER M. (2012). Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. *Emerg. Infect. Dis.*, **18**, 469–472.
- HOLDEN P. & HESS A.D. (1959). Cache Valley Virus, a previously undescribed mosquito-borne agent. *Science*, **130**, 1187–1188.
- HUANG C., SLATER B., CAMPBELL W., HOWARD J. & WHITE D. (2001). Detection of arboviral RNA directly from mosquito homogenates by reverse-transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **94**, 121–128.
- KARABATSOS N. (ED.) (1985). International Catalogue of Arboviruses Including Certain Other Viruses of Vertebrates, Third Edition. American Society for Tropical Medicine and Hygiene, San Antonio, Texas, USA.
- KIN Y.H., KWEON C.H., TARK D.S., LIM S.I., YANG D.K., HYUN B.H., SONG J.Y., HUR W. & PARK S.C. (2011). Development of inactivated trivalent vaccine for the teratogenic Aino, Akabane and Chuzan viruses. *Biologicals*, **39**, 152–157.
- KIRKLAND P.D., BARRY R.D., HARPER P.A. & ZELSKI R.Z. (1988). The development of Akabane virus-induced congenital abnormalities in cattle. *Vet. Rec.*, **122**, 582–586.

- KUNO G., MITCHELL C.J., CHANG G.J. & SMITH E.C. (1996). Detecting Bunyaviruses of the Bunyamwera and California serogroups by a PCR technique. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 1184–1188.
- KUROGI H., INABA Y., TAKAHSHI E., SATO K., GOTO Y., SATODA K. & OMORI T. (1978). Development of inactivated vaccine for Akabane disease. *Natl Inst. Anim. Health Q.*, **18**, 97–108.
- LEE J.K., PARK J.S., CHOI J.H., PARK B.K., LEE B.C., HWANG W.S., KIM J.H., JEAN Y.H., HARITANI M., YOO H.S. & KIM D.Y. (2002). Encephalomyelitis associated with akabane virus infection in adult cows. *Vet. Pathol.*, **39**, 269–273.
- LOEFFEN W., QUAK S., DE BOER-LUIJTZE E., HULST M., VAN DER POEL W., BOUWSTRA R. & MAAS R. (2012). Development of a virus neutralisation test to detect antibodies against Schmallenberg virus and serological results in suspect and infected herds. *Acta Vet. Scand.*, **54**, 44.
- MANSFIELD K.L., LA ROCCA S.A., KHATRI M., JOHNSON N., STEINBACH F. & FOOKS A.R. (2013). Detection of Schmallenberg virus serum neutralising antibodies. *J. Virol. Methods*, **188**, 139–144.
- MARRIOTT A.C., WARD V.K., HIGGS S. & NUTTALL P.A. (1990). RNA probes detect nucleotide sequence homology between members of two different nairovirus serogroups. *Virus Res.*, **16**, 77–81.
- MEEGAN J.M., YEDLOUTSCHNIG R.J., PELEG B.A., SHY J., PETERS C.J., WALKER J.S. & SHOPE R.E. (1987). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to RVF virus in ovine and bovine sera. *Am. J. Vet. Res.*, **48**, 1138–1141.
- MIYAZATO S., MIURA Y., HASE M., KUBO M., GOTO Y. & KONO Y. (1989). Encephalitis of cattle caused by Iriki isolate, a new strain belonging to Akabane virus. *Nihon Juigaku Zasshi*, **51**, 128–136.
- MORELI M.L., AQUINO V.H. & FIGUEIREDO L.T. (2001). Identification of Simbu, California and Bunyamwera serogroup bunyaviruses by nested RT-PCR. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **95**, 108–113.
- MUNZ E., REIMANN M., FRITZ T. & MEIER K. (1984). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to Nairobi sheep disease virus in comparison with an indirect immunofluorescent and haemagglutination test. II. Results observed with sera of experimentally infected rabbits and sheep and with African sheep sera. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **31**, 537–549.
- NODA Y., YOKOYAMA H., KATSUKI T., KURASHIGE S., UCHINUNO Y. & NARITA M. (2001). Demonstration of Akabane virus antigen using immunohistochemistry in naturally infected newborn calves. *Vet. Pathol.*, **38**, 216–218.
- PARSONSON I.M., DELLA-PORTA A.J. & MCPHEE D.A. (1982). Pathogenesis and virulence studies of Australian simbu serogroup bunyaviruses. In: *Viral Diseases in Southeast Asia and the Western Pacific*, Mackenzie J.S., ed. Academic Press, Sydney, Australia, 644–647.
- PARSONSON I.M., DELLA-PORTA A.J. & SNOWDON W.A. (1975). Congenital abnormalities in newborn lambs after infection of pregnant sheep with Akabane virus. *Infect. Immun.*, **15**, 254–262.
- QIAO J., WANG J., MENG Q., WANG G., LIU Y., HE Z., YANG H., ZHANG Z., CAI X. & CHEN C. (2013). Rapid detection of Akabane virus by a novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay (RT-LAMP). *Viol. J.*, **10**, 288.
- REUSKEN C., VAN DEN WIJNGAARD C., VAN BEEK P., BEER M., BOUWSTRA R., GODEKE G-J, ISKEN L., VAN DEN KERKHOF H., VAN PELT W., VAN DER POEL W., REIMERINK J., SCHIELEN P., SCHMIDT-CHANASIT J., VELLEMA P., DE VRIES A., WOUTERS I. & KOOPMANS M. (2012). Lack of evidence for zoonotic transmission of Schmallenberg virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **18**, 1746–1754.
- RODRIGUES HOFFMANN A., WELSH C.J., WILCOX VARNER P., DE LA CONCHA-BERMEJILLO A., MARCHAND BALL J., AMBRUS A. & EDWARDS J.F. (2012). Identification of the target cells and sequence of infection during experimental infection of ovine fetuses with Cache Valley virus. *J. Virol.*, **86**, 4793–4800.
- SAHU S.P., PEDERSEN D.D., RIDPATH H.D., OSTLUND E.N., SCHMITT B.J. & ALSTAD D.A. (2002). Serologic survey of cattle in the northeastern and north central United States, Virginia, Alaska, and Hawaii for antibodies to Cache Valley and antigenically related viruses (Bunyamwera serogroup virus). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **67**, 119–122.
- SEXTON D.J., ROLLIN P.E., BREITSCHWERDT E.B., COREY G.R., MYERS S.A., DUMAIS M.R., BOWEN M.D., GOLDSMITH C.S., ZAKI S.R., NICHOL S.T., PETERS C.J. & KSIĄZEK T.G. (1997). Life-threatening Cache Valley virus infection. *N. Engl. J. Med.*, **336**, 547–549.
- SHEPHERD N.C., GEE C.D., JESSEP T., TIMMINS G., CARROLL S.N. & BONNER R.B. (1978). Congenital bovine epizootic arthrogryposis and hydranencephaly. *Aust. Vet. J.*, **54**, 171–177.



- STRAM Y., KUZNETZOVA L., GUINI M., ROGEL A., MEIROM R., CHAI D., YADIN H. & BRENNER J. (2004). Detection and quantitation of akabane and aino viruses by multiplex real-time reverse-transcriptase PCR. *J. Virol. Methods*, **116**, 147–154.
- TSUDA T., YOSHIDA K., OHASHI S., YANASE T., SUEYOSHI M., KAMIMURA S., MISUMI K., HAMANA K., SAKAMOTO H. & YAMAKAWA M. (2004). Arthrogryposis, hydranencephaly and cerebellar hypoplasia syndrome in neonatal calves resulting from intrauterine infection with Aino virus. *Vet. Res.*, **35**, 531–538.
- TSUDA T., YOSHIDA K., YANASE T., OHASHI S. & YAMAKAWA M. (2004). Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the antibodies specific to akabane virus. *J Vet Diagn Invest.*, **16**, 571–576.
- UNGAR-WARON H., GLUCKMAN A. & TRAININ Z. (1989). ELISA test for the serodiagnosis of Akabane virus infection in cattle. *Trop. Anim. Health Prod.*, **21**, 205–210.
- VAN DEN BROM R., LUTTIKHOLT S.J., LIEVAART-PETERSON K., PEPPERKAMP N.H., MARS M.H., VAN DER POEL W.H. & VELLEMA P. (2012). Epizootic of ovine congenital malformations associated with Schmallerberg virus infection. *Tijdschr. Diergeneeskd.*, **137**, 106–111.
- VAN DER HEIJDEN H.M., BOUWSTRA R.J., MARS M.H., VAN DER POEL W.H., WELLENBERG G.J. & VAN MAANEN C. (2013). Development and validation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against Schmallerberg virus in blood samples from ruminants. *Res Vet Sci.*, **95**, 731–735.
- VAN DER POEL W.H., CAY B., ZIENTARA S., STEINBACH F., VALARCHER J.F., BØTNER A., MARS M.H., HAKZE-VAN DER HONING R., SCHIRRMIEIER H. & BEER M. (2014). Limited interlaboratory comparison of Schmallerberg virus antibody detection in serum samples. *Vet. Rec.*, **174**, 380.
- WANG H., NATANMAI S., KRAMER L.D., BERNARD K.A. & TAVAKOLI N.P. (2009). A duplex real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for the detection of California serogroup and Cache Valley viruses. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **65**, 150–157.
- WARD V.K., MARRIOTT A.C., POLYZONI T., EL GHORR A.A., ANTONIADIS A. & NUTTALL P.A. (1992). Expression of the nucleocapsid protein of Dugbe virus and antigenic cross-reactions with other nairoviruses. *Virus Res.*, **24**, 223–229.
- WERNIKE K., ESCHBAUMER M., SCHIRRMIEIER H., BLOHM U., BREITHAUPT A., HOFFMANN B. & BEER M. (2013). Oral exposure, reinfection and cellular immunity to Schmallerberg virus in cattle. *Vet. Microbiol.*, **165**, 155–159.
- YANASE T., KATO T., AIZAWA M., SHUTO Y., SHIRAFUJI H., YAMAKAWA M. & TSUDA T. (2012). Genetic reassortment between Sathuperi and Shamonda viruses of the genus *Orthobunyavirus* in nature: implications for their genetic relationship to Shmallerberg virus. *Arch. Virol.*, **157**, 1611–1616.
- ZELLER H. & BOULOY M. (2000). Infections by viruses of the families Bunyaviridae and Filoviridae. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **19**, 79–91.

\*  
\* \*

Para más información, materiales de referencia y asesoramiento, dirijase al  
*Friedrich-Loeffler-Institut*, en Insel Riems, Alemania.

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2004 COMO ENFERMEDADES BUNYAVIRALES DE ANIMALES (EXCLUYENDO LA FIEBRE DEL VALLE DEL RIFT); ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2014.