

SECCIÓN 3.10.

OTRAS ENFERMEDADES¹

CAPÍTULO 3.10.1.

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

RESUMEN

El orden Bunyavirales está formado por cientos de miembros distribuidos en 12 familias con un gran número de géneros. La mayoría de los virus de distintas familias se transmiten a los vertebrados mediante artrópodos (arbovirus). Los miembros de la familia Hantaviridae no son arbovirus.

Las familias de importancia en veterinaria son Nairoviridae, Peribunyaviridae y Phenuiviridae. El género Orthonairovirus contiene el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (véase el Capítulo 3.1.5) y el virus de enfermedad ovina de Nairobi (VEON), patógeno para los rumiantes. El género más amplio, Orthobunyavirus, que se subdivide en 103 especies víricas y 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), el virus Schmallenberg (VSB) y el virus Shuni (SHUV). 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, que fue descubierto 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. Otros miembros del orden Bunyavirales que tienen importancia veterinaria son el virus de la fiebre del Valle del Rift (VFVR), un miembro de la familia Phenuiviridae (género Phlebovirus) que se describe en el Capítulo 3.1.18 Fiebre del valle del Rift.

Los miembros de los géneros Orthonairovirus 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.

Detección e 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). 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 con transcripción inversa (RT-PCR) específicas de grupo y de virus para Orthobunyavirus.

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

El VAKA puede aislarse a partir de la sangre de animales virémicos y ocasionalmente a partir de material fetal y se pueden utilizar líneas celulares de mosquito. El virus o el antígeno se identifican mediante FA, IHC o VN. Se han desarrollado distintos tipos de técnicas de RT-PCR para el VAKA 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/SNC, empleando distintas líneas celulares: células de insecto (KC; C6/C36) o células BHK de mamífero o células Vero. No obstante, el aislamiento puede ser difícil y la adaptación al cultivo celular es necesaria para un crecimiento suficiente in vitro del VSB. Se han establecido varias 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 VEON se aísla mejor del plasma, de los ganglios linfáticos mesentéricos o del bazo de los animales febriles. Los cultivos de células BHK y de células de cordero son los más sensibles para el aislamiento. La identificación del virus puede realizarse mediante FAT en los cultivos de tejidos inoculados. Los cultivos de tejidos infectados pueden utilizarse como fuentes de antígenos de fijación del complemento o de enzimoanálisis (ELISA). Sin embargo, en lo que respecta al VVC, el VAKA y el VSB, la RT-PCR en tiempo real es la técnica de detección más sensible y fiable y se han desarrollado y validado varios protocolos.

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. En las pruebas de neutralización vírica se obtienen resultados ambiguos, un rasgo que comparte con otros miembros del grupo Nairovirus. Ahora también se están desarrollando y evaluando técnicas ELISA para la EON.

Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico: Actualmente no se dispone de vacuna para el VVC. Se han producido vacunas contra el VAKA y se han utilizado, por ejemplo, en Japón. En el caso del VEON, 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. Contra el VSB, se han desarrollado varios tipos de vacunas (vacunas vivas modificadas, vacunas vector, vacunas de subunidad y vacunas inactivadas), y en Europa están autorizadas las vacunas inactivadas.

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* teratogénico (familia *Peribunyaviridae*) de las Américas que afecta sobre todo a las ovejas y las cabras gestantes. En escasísimas ocasiones se ha descrito esta enfermedad en el ser humano. La infección experimental de fetos ovinos ha confirmado el papel que desempeña el VVC en la aparición de malformaciones (Rodrigues Hoffman et al., 2012). Es el miembro 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, 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 contra el VCC en rumiantes domésticos y salvajes y en caballos, por ejemplo, Uehlinger *et al.* (2018) hallaron tasas de positividad en Canadá del 20% en ganado bovino, del 33% en cabras, del 69% en caballos y del 51% en ciervo mulo. Una viremia de entre 1 y 3 días es suficiente para infectar vectores, permitiendo a los ciervos actuar como hospedadores propagadores (Blackmore y 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 tortícolis, 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 (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, ovino y caprino. También se han hallado anticuerpos contra el VAKA en caballos, asnos, búfalos, ciervos, camellos y jabalíes, pero no se ha descrito enfermedad asociada al VAKA en ninguna de estas especies. Es un miembro del serogrupo Simbu² del género *Orthobunyavirus*, familia *Peribunyaviridae*. 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 también pueden causar malformaciones en los rumiantes (Parsonson *et al.*, 1982; Tsuda *et al.*, 2004). 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.

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.

La infección por el VAKA en animales adultos suele ser subclínica, pero se ha asociado a encefalomiелitis en ganado bovino adulto en Japón (Kirkland, 2015). Los rumiantes seroconvierten tras una viremia de 3–7 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, 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 aproximadamente entre los días 105 y 170 de la gestación y artrogriposis entre los días 103–174 (Kirkland 2015). 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 polimiositis 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 y de Asia occidental. También se ha sospechado de infección pasada en África.

El VSB pertenece a la familia *Peribunyaviridae*, género *Orthobunyavirus*, y es uno de los virus del serogrupo Simbu (Hoffman *et al.*, 2011). Es importante destacar que hasta 2011 en Europa nunca se habían detectado 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, los muflones 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. Se han hallado anticuerpos en varios rumiantes salvajes y en cautividad y en algunos animales de zoológico.

La infección experimental en ganado bovino y ovino no gestante 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* y se puso de manifiesto la competencia del vector. La transmisión vertical a través de la placenta se ha demostrado, pero la infección directa entre animales es muy improbable. La

infección experimental no funcionó por vía oral y los animales 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).

Los signos clínicos de los fetos o recién nacidos 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, tortícolis, escoliosis, hipoplasia cerebelar y aumento de tamaño del timo. La tasa de malformación varía en función de la fase de la gestión en la que tenga lugar la infección.

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

4. Virus de la enfermedad ovina de Nairobi

La enfermedad ovina de Nairobi (EON) es una enfermedad de ovejas y cabras causada por el virus de la EON (VEON), un *Orthonairovirus* de la familia *Nairoviridae*. La enfermedad ha sido identificada principalmente en países de África oriental, donde su distribución parece estar limitada por el alcance de las garrapatas vector portadoras del VEON. En África, el vector dominante es la garrapata ixódida *Rhipicephalus appendiculatus*, aunque también se han encontrado garrapatas de la especie *Amblyomma variegatum* portadoras del virus y son competentes para su transmisión (Daubney y Hudson, 1934). Es importante destacar que ahora se sabe que el virus está presente en el sur de Asia y en China. La secuenciación molecular ha demostrado que un virus previamente aislado de garrapatas *Haemaphysalis* en la India y Sri Lanka (donde era conocido como el virus Ganjam) (Sudeep et al., 2009) es también VEON (Marczinke y Nichol, 2002), y el ARN del mismo virus se ha encontrado recientemente en garrapatas *Haemaphysalis* en el noreste (Gong et al., 2015) y el centro (Yang et al., 2019) de China. A pesar de esta amplia distribución del virus, no se ha registrado ninguna enfermedad en pequeños rumiantes en Asia que pueda atribuirse al VEON, aparte de un brote en ovejas europeas importadas (Ghalsasi et al., 1981).

En África, la EON 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 y las ovejas son más susceptibles, 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 VEON, 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 VEON (Zeller y 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 precural. 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 mucoide 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 *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, 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 cowdriosis (*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.

El VEON 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 y Bouloy, 2000).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1.1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico del VVC y su finalidad

[en preparación]

Tabla 1.2. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico del VAKA y su finalidad

Método	Finalidad					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección e identificación del agente						
Aislamiento del virus	–	+	–	+	–	–
RT-PCR	–	+++	–	+	++	–
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA	+++	+++	+++	+++ ^(a)	+++	+++
VN	+++	+++	+++	+++ ^(a)	+++	+++

Clave: +++ = método recomendado para esta finalidad; ++ = método recomendado, pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para esta finalidad.

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; ELISA = enzimoimmunoanálisis; VN = neutralización del virus. ^(a)Adecuado para la confirmación de casos clínicos solo cuando las muestras fetales se analizan antes de la ingesta de calostro.

Tabla 1.3. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico del VSB y su finalidad

Método	Finalidad					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección e identificación del agente						
Aislamiento del virus	–	+	–	+	–	–
RT-PCR	–	+++	–	+++	++	–

Método	Finalidad					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA	+++	+++	+++	+(a)	+++	+++
VN	+++	+++	+++	+(a)	+++	+++
IFAT	+++	+++	+++	+(a)	+++	+++

Clave: +++ = método recomendado para esta finalidad; ++ = método recomendado, pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para esta finalidad.

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; ELISA = enzimoimmunoanálisis; VN = neutralización del virus; IFAT = prueba de inmunofluorescencia indirecta

^(a)Adecuado para la confirmación de casos clínicos solo cuando las muestras fetales se analizan antes de la ingesta de calostro

Table 1.4. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico del VEON y su finalidad

Método	Finalidad					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección e identificación del agente						
Aislamiento del virus en cultivo celular	–	–	–	++	–	–
RT-PCR en tiempo real	–	++	++	+++	+	–
Detección de respuesta inmunitaria						
VN	+	–	–	++	++	++
Tinción por fluorescencia (IFAT)	–	–	–	+	–	+

Clave: +++ = método recomendado para esta finalidad; ++ = método recomendado, pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para esta finalidad.

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; VN = neutralización del virus; (I)FAT = prueba de inmunofluorescencia directa o indirecta

B.1. Detección e identificación del agente

1. 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%.

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). RT-PCR descritas previamente permiten distinguir los virus del serogrupo CAL y la mayoría de los del serogrupo BUN de otros miembros del género *Orthobunyavirus* (Kuno *et al.*, 1996; Moreli *et al.*, 2001). Se ha desarrollado una RT-PCR en tiempo real doble para el serogrupo CAL y para el VVC (Wang *et al.*, 2009), y más recientemente una PCR en tiempo real que amplifica el segmento M de la glicoproteína 1 del VVC y otros genes de interés (Hoffmann *et al.*, 2013). No obstante, las pruebas todavía no están validadas para aplicarlas a la veterinaria.

El antígeno del VVC puede detectarse mediante inmunohistoquímica en cortes de tejido infectado utilizando suero policlonal hiperinmune de conejo purificado contra el VVC propagado en células Vero (Hoffmann *et al.*, 2012).

Véase en Waddell *et al.* (2019) una revisión y un análisis de las carencias de los estudios publicados sobre el VVC.

2. Virus Akabane

El diagnóstico de la infección raramente se realiza mediante el aislamiento del virus, sino que normalmente se lleva a cabo mediante RT-PCR, serología (ELISA, VN) aplicada a líquidos fetales, ocasionalmente mediante RT-PCR en tiempo real y, en ocasiones, histopatología. El virus se puede aislar fácilmente 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 VAKA.

El aislamiento del virus en cultivo de tejidos a menudo se lleva a cabo en 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 BHK o 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 monoespecíficos o monoclonales incluyen la neutralización vírica (VN) y la inmunofluorescencia (FA) (Blacksell *et al.*, 1997; Gard *et al.*, 1988). La detección de antígenos mediante tinción con inmunoperoxidasa puede utilizarse en material fetal bovino y ovino fijado con formalina y en terneros recién nacidos infectados de forma natural (Noda *et al.*, 2001).

Se han desarrollado métodos de RT-PCR para la detección de los ácidos nucleicos del VAKA, pero deben realizarse RT-PCR adicionales específicas para los virus Aino, Peaton y Tinaroo o RT-PCR múltiplex en tiempo real o secuenciación para excluir las reacciones cruzadas (Yang *et al.*, 2008; Yildirim *et al.*, 2015). Se han desarrollado métodos de RT-PCR multiplex en tiempo real (Ohasi *et al.*, 2004; Shirafuji *et al.*, 2015) para la detección directa rápida y sensible de múltiples arbovirus, incluido el VAKA.

3. El virus Schmallenberg

El virus de Schmallenberg (VSB) puede detectarse mediante RT-PCR en tiempo real (Bilk *et al.*, 2012; Vengust *et al.*, 2020). También están disponibles varios kits comerciales de PCR. Se desarrolló una RT-PCR múltiplex en tiempo real de un solo paso (mRT-PCR en tiempo real de un solo paso) para la detección y diferenciación simultánea de VSB, KAVA y VAIN (Lee *et al.*, 2015) y se describió una RT-PCR genérica específica para cada serogrupo seguida de análisis de secuencias (Golender *et al.*, 2018).

El virus infeccioso se puede aislar en cultivo celular, para lo cual se han empleado células infectadas (KC, C6/C36), células de hámster (BHK) o células de riñón de mono (Vero). Las muestras para la detección o aislamiento del virus deben transportarse refrigeradas o congeladas. El suero o sangre tratados con 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 terneros, 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 y los cambios no son específicos del VSB.

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.

3.1. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real

El método presentado aquí va dirigido al segmento S del VSB (Bilk *et al.*, 2012) y detecta cepas de diferentes ubicaciones geográficas y presentaciones clínicas. Puede ser necesario modificar el procedimiento para adaptarlo a las necesidades de cada laboratorio o a los distintos kits de RT-PCR.

- i) Extracción de ARN de muestras de sangre o tejido, de mosquitos o de esperma

Existe una gran disponibilidad comercial de kits; la extracción del ARN puede realizarse a partir de las siguientes matrices de muestra: sangre, suero, tejidos o parásitos, según los procedimientos especificados en cada kit. Con las muestras de semen, la sensibilidad depende de la aplicación de métodos optimizados de extracción de ácidos nucleicos que combinen la lisis del reactivo Trizol(R) LS con la purificación del ARN vírico mediante perlas magnéticas.

- ii) Secuencias de los cebadores y de la sonda (5' → 3')

SBV-S-382F: TCA-GAT-TGT-CAT-GCC-CCT-TGC

SBV-S-469R: TTC-GGC-CCC-AGG-TGC-AAA-TC

SBV-S-408FAM: FAM-TTA-AGG-GAT-GCA-CCT-GGG-CCG-ATG-GT-BHQ1

- iii) Preparación de las mezclas de reacción

En cada PCR, deben incluirse controles apropiados. Como mínimo, debe incluirse un control sin molde (NTC, sólo reactivos), controles negativos apropiados, por ejemplo, 1 por cada 10 muestras problema, y un control positivo. Las amplificaciones por PCR se realizan en un volumen de 25 µl. Antes de la PCR, se prepara una mezcla primaria con todos los componentes excepto el ARN molde. A continuación, se dispensa en tubos o placas de PCR. Después, se añade a los tubos el ARN problema o control (5 µl). Este método minimiza los errores de pipeteo cuando se analizan grandes cantidades de muestras. La mezcla primaria comprende (por reacción) 12,5 µl de tampón 2 × para RT-PCR, 1,0 µl de mezcla enzimática 25 × para RT-PCR, 4,5 µl de agua libre de nucleasas y 2 µl de mezcla de cebador-sonda específica del VSB (cebadores específicos del VSB cada cual a una concentración de 10 µM + sonda específica del VSB 1,875 µM).

- iv) Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real

Un total de 10 minutos a 45°C; 10 minutos a 95°C; 42 ciclos de: 15 segundos a 95°C, 20 segundos a 55°C, y 30 segundos a 72°C. Aparece fluorescencia en el modo del paso de 55°C.

4. Virus de la enfermedad ovina de Nairobi

Recientemente se han revisado técnicas de laboratorio de detección del VEON (Hartlaub *et al.*, 2021). Actualmente no se comercializan kits para detectar este virus. El método más sencillo para confirmar la infección por VEON es uno de los métodos publicados para RT-PCR en tiempo real (Bin Tarif *et al.*, 2012; Hartlaub *et al.*, 2021). Como en el caso de los demás bunyavirus, la RT-PCR en tiempo real es el estándar para la detección y confirmación del VEON. El virus vivo también puede detectarse mediante cultivo celular.

4.1. RT-PCR en tiempo real

El ARN debe purificarse primero a partir de muestras de sangre o tejido. El ARN vírico puede detectarse en sangre total o suero, o en hisopos nasales o rectales. Los mejores tejidos para detectar este virus parecen ser el bazo, el hígado, el epitelio nasal y el epitelio conjuntival (Hartlaub *et al.*, 2021). Las muestras

de tejido deben extraerse con fenol de guanidina tiocianato acidificado utilizando uno de los preparados que se comercializan. Los tejidos sólidos (0,5-1,0 g) se pican y homogeneizan con 10 ml de reactivo. Los hisopos pueden extraerse con el mismo reactivo y la sangre entera o el suero homogeneizarse también con este reactivo; a continuación, el ARN se purifica siguiendo las instrucciones del fabricante. Para tejidos, sangre, suero o hisopos, también es adecuada la extracción de ARN mediante perlas magnéticas o columnas de centrifugación. El ARN resultante se conserva a -70°C (o a -20°C si no se dispone de medios que permitan alcanzar los -70°C) hasta que se necesite.

La RT-PCR se basa en la amplificación de una sección del segmento S del virus. Los protocolos publicados utilizan los mismos cebadores directos e inverso, y solo difieren en el uso de SybrGreen (Bin Tarif et al., 2012) o una sonda TaqMan (Hartlaub et al., 2021) para la detección. Se indica el protocolo que utiliza la sonda TaqMan; la receta de la mezcla primaria y las condiciones de termociclado indicadas corresponden a un kit específico de RT-PCR de un paso; también pueden utilizarse otros reactivos, pero las concentraciones de cebadores y sondas y el protocolo de termociclado deben optimizarse para otros reactivos.

i) Cebadores y sondas utilizados (5' → 3'):

Cebador directo (F1): TGA-CCA-TGC-AGA-ACC-AGA-TYG

Cebador inverso (R1A): GAA-ACA-AGC-CTC-ATG-CTA-ACC-T

Sonda (P1): FAM-CAA-GGA-TGC-CAT-CCT-TGC-ATG-GCA-BHQ1

ii) Reacciones al usar el kit de RT-PCR QuantiTect Probe:

Añadir 5 µl de ARN problema a 20 µl de mezcla de reacción que contenga:

Reactivo	Mezcla (1 reacción)	Concentración final
Mezcla primaria para RT-PCR 2x	12,5 µl	
Mezcla para RT	0,25 µl	
Sonda P1 (1 µM)	0,5 µl	20 nM
Cebador F1 (1 µM)	2 µl	80 nM
Cebador R1A (1 µM)	2 µl	80 nM
Agua	2,75 µl	
Volumen final	20 µl	

iii) Protocolo de termociclado

50°C durante 30 minutos	1 ciclo	Paso de transcripción inversa
95°C durante 15 minutos	1 ciclo	Inactiva la RT y activa la polimerasa
95°C durante 15		
63°C durante 30	48 ciclos	Amplificación mediante PCR del ADNc
72°C durante 30		

4.2. Aislamiento del virus

El VEON se puede aislar a partir de material recogido de muestras de campo mediante el uso de cultivos celulares (Davies et al., 1977a). 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), estreptomicina sulfato (500 µg/ml), y nistatina (50 unidades/ml) o anfotericina B (2,5 µg/ml).

La línea celular BHK-21-Clon 13 es especialmente valiosa para aislar el virus en cultivo celular, pero también se ha empleado otros clones de BHK-21, células SW13, células Vero y cultivos primarios y secundarios de riñón de hámster o de cordero (Shepherd *et al.*, 1978). La mayoría de las cepas del virus de la EON produce un efecto citopático (ECP) en el primer pase empleando células BHK-21, aunque otras producen un ECP más evidente solo después de un pase. El ECP no es específico del VEON, lo cual puede confirmarse en el ARN purificado a partir de células infectadas mediante RT-PCR, como en B1.4.1 o, en cultivos con cubreobjetos, mediante inmunofluorescencia si se dispone de un antisuero específico contra el VEON. Si se va a utilizar la inmunofluorescencia para la confirmación, se utilizarán cultivos con y sin cubreobjetos volantes o se prepararán también cultivos en portaobjetos de micropocillos. Se inoculará un volumen adecuado de muestra, dependiendo del tamaño del frasco, plato o pocillo utilizado, en la monocapa celular y se dejará transcurrir un período de 1 a 2 horas para la adsorción. Aparece ECP en los cultivos de células BHK en forma de focos de células granulares redondeadas al cabo de 24-48 horas, y en otras 24-48 horas en otros tipos de células. La tinción con FA puede ser positiva incluso 24-48 horas después de la inoculación, cuando aún no se ha hecho evidente el ECP. Los anticuerpos para la tinción inmunofluorescente pueden prepararse a partir de líquidos ascíticos de ratones hiperinmunes y de sueros de ratones, conejos u ovejas inmunes mediante métodos estándar. Dichos anticuerpos pueden conjugarse directamente para la tinción FAT, o puede utilizarse un conjugado secundario específico de la especie (IFAT). Puede producirse cierta fluorescencia cruzada con otros nairovirus a diluciones bajas del anticuerpo, pero en ovejas y cabras, estos virus no suelen asociarse a la enfermedad.

B2. Pruebas serológicas

Pueden ser pruebas de inhibición de la hemoaglutinación (HI), CF, IFAT, 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

Las pruebas de neutralización del virus (VN) para el VVC solían realizarse mediante un método de neutralización por reducción de placas, que puede mostrar cierta reactividad cruzada con los anticuerpos contra virus del serogrupo BUN relacionados (Beaty *et al.*, 1989), 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 DICT₅₀ (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 CO₂ 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 DICT₅₀ 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 consistieron en el recubrimiento de las placas con líquido ascítico de ratón, seguido de una adición de antígeno de cerebro de ratón en sacarosa/acetona en un formato de ELISA tipo sándwich. No obstante, no deben utilizarse métodos alternativos para producir el antígeno (como cultivo celular amplificado o producido por tecnologías recombinantes) en lugar del extracto de cerebro de ratón. 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).

2. El virus Akabane

Las pruebas serológicas pueden utilizarse para analizar el suero o el plasma y, en los fetos nacidos muertos o privados de calostro, la detección de anticuerpos en los líquidos pericárdico y pleural también confirmará la infección *in utero*.

2.1. Prueba de neutralización del virus

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.

2.1.1. 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 1/4 a la 1/128 en una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano empleando pocillos por duplicado y 50 µl por pocillo. Los controles estándar se preparan de manera similar.
- iii) En cada pocillo se añaden 50 µl de virus en medio de Eagle diluido hasta conseguir 100 DICT₅₀ 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 50 µl por pocillo.
- vi) Se añaden 100 µl por pocillo de suspensión celular medio de Eagle con suero al 2%, a una densidad de 5×10^5 células/ml.
- vii) Las placas se incuban a 34–37°C durante 5 días en una incubadora de CO₂ 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 DICC₅₀ 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 100 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.

2.2. Enzimoimmunoanálisis

Se han descrito varios ELISA para el VAKA, que emplean IgG e IgM. El antígeno de revestimiento es 10^6 DICT₅₀ 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.

Hay dos ensayos disponibles comercialmente como kits para su uso en muestras de suero y plasma de bovinos, ovinos y caprinos. Uno de ellos es un ELISA de competición basado en el VAKA purificado para la detección de anticuerpos contra el VAKA, mientras que el otro es un ELISA indirecto basado en la proteína N del VSB purificado que se utiliza para la detección de anticuerpos contra el VSB y otros virus del serogrupo Simbu. Los ensayos tienen diferentes sensibilidades y especificidades de diagnóstico (Li *et al.*, 2019; Tsuda *et al.*, 2004b). En concreto, la prueba basada en la proteína N del VSB tiene una amplia reactividad con anticuerpos contra otros miembros del serogrupo Simbu, pero también puede hallarse cierta reactividad cruzada con el ELISA de competición para el VAKA.

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 se comercializan; ii) la prueba de la inmunofluorescencia indirecta; y iii) la VN.

3.1. Enzimoimmunoanálisis

Se han desarrollado varios tipos de ELISA, incluidos kits comerciales.

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

3.2. Prueba de 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 DICT₅₀/50 µl (2000 DICT₅₀/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 log₂ por duplicado o cuadruplicado, empezando con 1/10 y llegando hasta 1/1280. Los pocillos se llenan previamente con 180 µl de medio de cultivo, y se añaden 20 µl de suspensión de virus problema a una dilución de 1/10, y finalmente 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 CO₂. Durante este periodo de tiempo, tiene lugar el proceso de neutralización.
- v) Tras el periodo de incubación, se añaden 100 µl 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 CO₂ para la incubación.
- vi) Se incuban las placas a 34–37°C durante 3–4 días en una incubadora de CO₂.
- 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 DICT₅₀, y el suero control positivo presenta el título indicado (\pm un paso de log₂).

El título de anticuerpos se calcula como la ND₅₀ 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. Virus de la enfermedad ovina de Nairobi

4.1. Neutralización del virus en cultivo celular

El título de anticuerpos neutralizantes contra el VEON puede evaluarse mediante la inhibición de la infección en placas de microtitulación de 96 pocillos o la reducción del número de placas en placas de 6 pocillos. Para estos ensayos se han utilizado células BHK-21 y SW13. En cada caso, los sueros se calientan a 56°C durante 30 minutos antes de su utilización para inactivar el complemento.

4.1.1. Inhibición de la infección en placas de microtitulación

- i) El procedimiento requiere una reserva de VEON con un título conocido (determinado en la línea celular que se va a utilizar para la prueba de neutralización) y una reserva de esas células, tripsinizadas en suspensión y ajustadas a 2×10^5 /ml (BHK-21) o 10^5 /ml (SW13) (5 ml de células por placa de 96 pocillos).
- ii) Cada dilución de suero se analiza en al menos cuatro pocillos repetidos. Se preparan diluciones de suero seriadas a la mitad (a partir de 1/5 o 1/10, según el título esperado) en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (50 µl/pocillo).

- iii) Se añaden 50 µl de medio de mantenimiento que contenga aproximadamente 100 DICT₅₀ de VEON, se mezcla bien pipeteando arriba y abajo, se cubre la placa y se incuba durante 1 hora a 37°C.
- iv) Se valora la reserva de virus diluido para garantizar que la concentración se encuentra en el intervalo de 90-150 DICT₅₀ por 50 µl.
- v) Se añaden 50 µl de suspensión celular por pocillo, se mezcla golpeando los lados de la placa y se incuban las placas a 37°C, con un 5% de CO₂.
- vi) Los pocillos se puntúan directamente respecto al ECP a los 5 dpi (células BHK-21) o se fijan con formalina tamponada neutra a los 7 dpi y se tiñen con violeta cristal al 0,1% para visualizar las lesiones (células SW13).
- vii) El título neutralizante es la dilución de suero que inhibe la infección en el 50% de los pocillos de replicación (ND₅₀), que puede calcularse mediante la ecuación de Spearman-Kärber. Si X1 es la mayor dilución a la cual ningún pocillo muestra ECP y ΣP es la suma de las proporciones de pocillos no infectados a partir de la fila X1, el ND₅₀ es 10m donde $m = (\log[X1] - \log[2] \times [\Sigma P - 0,5])$. Por ejemplo, para X1=1/40 y ΣP=1,75, $m = -1,6 - (0,301 \times 1,25) = -1,97625$, y ND₅₀ = 1/94,68.

4.1.2. Reducción de placas

- i) Las células SW13 se ponen en placas de 6 pocillos y deben ser subconfluentes cuando se utilicen.
- ii) Se mezclan diluciones de suero a la mitad (600 µl) con aproximadamente 50 DICT₅₀ de VEON en 600 µl de medio de mantenimiento, y se incuban durante 1 hora a 37°C.
- iii) Se retira el medio de las células en placas de seis pocillos y se sustituye por alícuotas de 500 µl de esta mezcla (por duplicado). Las placas se incuban durante 1 hora a 37°C, con agitación suave cada 15 minutos. Los pocillos control se infectan con virus incubados sin suero.
- iv) Se prepara un recubrimiento mezclando volúmenes iguales de una solución esterilizada en autoclave de 1,8% de Bacto-Agar y MEM 2× que contenga un 4% de FCS y penicilina/estreptomicina 2x, y se mantiene a ~40°C para evitar que se solidifique.
- v) Se retiran los inóculos y se recubren las células con 2 ml por pocillo de Bacto-Agar/MEM, se deja fraguar el recubrimiento a temperatura ambiente (15-20 minutos) y luego se incuban las placas a 37 ° C en un incubador de CO₂.
- vi) Transcurridos 4 días, se añade una segunda superposición de violeta cristal al 0,1% en formalina neutra tamponada. Transcurridas otras 24 horas, se retiran las superposiciones y se cuentan visualmente las placas. El número medio de placas en los pocillos control se fija en el 100%, y el título neutralizante es la mayor dilución de suero que sigue reduciendo el número de placas en un 80% (PRNT₈₀).

4.2. Prueba de inmunofluorescencia indirecta

La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) también puede utilizarse 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 contra el VEON 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 EON³ es el virus utilizado para preparar el antígeno en los estudios originales, una cepa que se ha adaptado a crecer en células BHK-21-Clon13, después de una serie de pases. Se ha observado que muchas otras cepas del VEON crecen en estas células, en células BSR-T7 (un derivado de las células BHK) o en células Vero. El ECP se reduce en gran medida en las células Vero, y ello puede resultar ventajoso para la preparación de antígeno (monocapas celulares infectadas) para esta prueba.

El antígeno del virus en el sustrato celular elegido puede prepararse para la prueba en cubreobjetos sueltos, en portaobjetos multipocillo con cámara, portaobjetos multipocillo con impresión de PTFE (teflón) o en placas de microtitulación de fondo plano. Si se utilizan cubreobjetos sueltos, los de 9 mm de diámetro son adecuados para las placas multipocillo de 12 pocillos. Se describe un método que utiliza portaobjetos multipocillo impresos en PTFE.

4.2.1. Preparación de los portas con antígeno

- i) Se lavan y esterilizan los portas. Esto se realiza brevemente en caliente con un detergente que se usa para material de vidrio en los laboratorios de cultivo de tejidos; y después se enjuagan durante 30 minutos tres veces bajo agua corriente, seguido en cada ocasión por enjuagues similares en agua destilada/desionizada. A continuación, se sumergen en etanol al 70% durante 10 minutos, se sacan con unas pinzas estériles y se envuelven en papel a prueba de grasa. Entonces los portas podrán 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.
- iii) Se prepara una suspensión de células BHK conteniendo aproximadamente 25.000 células/ml en medio de crecimiento, y se añaden por cada mililitro 1.000 DICC₅₀ del VEON. Se mezcla con la pipeta.
- iv) Se añaden las células infectadas en volúmenes de 50 µl (para el tamaño de pocillo 12) o el volumen apropiado para el tamaño de los pocillos de los portas con PTFE. Se vuelven a colocar las tapas en las placas y se colocan en una incubadora de CO₂ con atmósfera humidificada. Se preparan portas control negativos de la misma forma utilizando células no infectadas.
- 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; cada laboratorio debe determinar el momento óptimo de recogida de las células y cepas víricas fijando y tiñendo los portas después de 24, 36 y 48 horas).
- vii) Los portas se lavan tres veces con PBS y las células se fijan. Esto se puede hacer utilizando calor seco (mínimo 80°C) o con acetona enfriada en hielo o metanol:acetona (1:1) durante 10 minutos. Tras fijar en acetona o metanol:acetona, se lavan los portas tres veces (5 minutos por lavado) en PBS y después se dejan secar al aire. 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 sueltos o en placas multipocillo o portas multipocillo con cámara. Cuando se emplean placas de plástico multipocillo para cultivo de tejidos, la fijación no debe realizarse con acetona al 100%.

4.2.2. Procedimiento analítico

- i) Los portas se hidratan añadiendo una gota de PBS a cada pocillo con una pipeta Pasteur. El número de portas debe concordar con el número de sueros a ensayar; se necesitan al menos

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.

12 portas por suero. Se incluyen sueros control positivo y negativo, con cultivos de células infectadas y no infectadas, en cada ejecución de la prueba.

- ii) Se prepara una serie de diluciones a la mitad para cada suero, empezando 1/80 y terminando en 1/2560 (6 diluciones).
- iii) 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.
- iv) Se disponen los portas en placas y se mantienen a 37°C en una incubadora con ambiente húmedo durante 40 minutos.
- v) Se lavan los portas colocados en gradillas realizando tres cambios de PBS, 5 minutos por lavado.
- vi) Se añade el conjugado antiespecie (normalmente anti-oveja o anti-cabra) conjugado a fluoresceína a una dilución de trabajo predeterminada (debe determinarse en cada laboratorio en función del anticuerpo conjugado que se utilice); se puede añadir una gota a cada pocillo con una pipeta Pasteur u otro tipo de pipeta.
- vii) Se incuban como antes durante 30 minutos.
- viii) Los portas se lavan tres veces con PBS y se secan.
- ix) Los portas se examinan al microscopio de fluorescencia. El antígeno del VEON 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 las células control no infectadas.
- ix) Los sueros que muestren esta fluorescencia a las diluciones 1/640 o 1/1.280 serán indicativos de infección reciente por el VEON (Davies *et al.*, 1976).

4.3. Otras pruebas

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 (Hartlaub *et al.*, 2021). La neutralización vírica o la prueba de IFAT, sin embargo, se emplean para comprobar resultados dudosos (Munz *et al.*, 1984). Además, se están evaluando nuevos ELISA (Hartlaub *et al.*, 2021).

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

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Virus del Valle de Cache

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

2. 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

Tres vacunas comerciales inactivadas para proteger al ganado ovino y bovino de la infección por el VSB han recibido la aprobación reglamentaria europea. Se han desarrollado otras formas de vacunas (vivas modificadas recombinantes, vectoriales, vacunas de subunidades) que se encuentran en diferentes niveles de evaluación (Wernike y Beer, 2020).

La mayoría de los ensayos mostraron una alta eficacia y seguridad de los diferentes enfoques de vacunas para proteger contra el VSB.

5. Virus de 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

BEATY B.J., CALISHER C.H. & SHOPE R.S. (1989). Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. Washington, USA. Am. Public Health Assoc., 797–856.

BEER M., CONRATHS F.J., VAN DER POEL W.H. (2012). 'Schmallerberg 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 Schmallerberg 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. & COLLISSON 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. & COLLISSON E.W. (1990). Congenital malformations in sheep resulting from *in utero* inoculation of Cache Valley virus. *Am. J. Vet. Res.*, **51**, 1645–1648.
- 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.
- DAUBNEY R. & HUDSON J.R. (1934). Nairobi sheep disease; natural and experimental transmission by ticks other than *Rhipicephalus appendiculatus*. *Parasitology*, **26**, 496–509.
- 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., COLLISSON 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>
- 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.

- GHALSASI G.R., RODRIGUES F.M., DANDAWATE C.N., GUPTA N.P., KHASNIS C.G., PINTO B.D. & GEORGE S. (1981). Investigation of febrile illness in exotic and cross-bred sheep from Sheep Farm, Palamner in Andhra Pradesh. *Indian J. Med. Res.*, **74**, 325–331. PubMed PMID: 6797937.
- GOLENDER N., BUMBAROV V. Y., ERSTER O., BEER M., KHINICHY. & WERNIKE K. (2018). Development and validation of a universal S-segment-based real-time RT-PCR assay for the detection of Simbu serogroup viruses. *J. Virol. Methods*, **261**, 80–85.
- GONG S., HE B., WANG Z., SHANG L., WEI F., LIU Q. & CHANGCHUN T. (2015). Nairobi sheep disease virus RNA in ixodid ticks, China, 2013. *Emerg. Infect. Dis.*, **21**, 718–720. doi: 10.3201/eid2104.141602. PubMed PMID: 25811222; PubMed Central PMCID: PMC4378503.
- HARTLAUB J., GUTJAHR B., FAST C., MIRAZIMI A., KELLER M. & GROSCHUP M.H. (2021). Diagnosis and Pathogenesis of Nairobi Sheep Disease Orthonairovirus Infections in Sheep and Cattle. *Viruses*, **13**, 1250. doi: 10.3390/v13071250. PMID: 34199054; PMCID: PMC8310034.
- HOFFMANN A.R., DORNIK P., FILANT J., DUNLAP K.A., BAZER F.W., DE LA CONCHA-BERMEJILLO A., WELSH C.J., VARNER P. & EDWARDS J.F. (2013). Ovine Fetal Immune Response to Cache Valley Virus Infection. *J. Virol.*, **87**, 5586–5592. <https://doi.org/10.1128/JVI.01821-12>
- HOFFMANN B., SCHEUCH M., HÖPER D., JUNGBLUT R., HOLSTEG M., SCHIRRMIEIER 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.*, 2012, **18**, 469–472.
- HOFFMANN A.R., WELSH C.J., VARNER P.W., DE LA CONCHA-BERMEJILLO A., BALL J.M., 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. <https://doi.org/10.1128/JVI.06858-11>
- 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.
- KIM 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. (2015). Akabane virus infection. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **34**, 403–410.
- 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., TAKAHASHI 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.H., SEO H.J., PARK J.Y., KIM, S.H., CHO Y.S., KIM Y.J., CHO I.S. & JEOUNG H.Y. (2015). Detection and differentiation of Schmallenberg, Akabane and Aino viruses by one-step multiplex reverse-transcriptase quantitative PCR assay. *BMC Vet. Res.*, **11**, 270. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0582-7>
- LI X., JING H., LIU X., WANG Q., QIU S., LIU D., WU S. & LIN X. (2019). Comparative evaluation of two commercial ELISA kits for detection of antibodies against Akabane virus in cattle serum. *BMC Vet. Res.*, **15**, 408. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2156-6>
- 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.
- MARCZINKE B.I. & NICHOL S.T. (2002). Nairobi sheep disease virus, an important tick-borne pathogen of sheep and goats in Africa, is also present in Asia. *Virology*, **303**, 146–151. PubMed PMID: 12482666

- 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.
- 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.
- OHASI S., YOSHIDA K. & YANASE T. (2004). Simultaneous detection of bovine arboviruses using single-tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **120**, 79–85.
- PARNSONSON 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.
- PARNSONSON 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.
- 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.
- 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. & KSIAZEK 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.
- SHIRAFUJI H., YAZAKI R., SHUTO Y., YANASE T., KATO T., ISHIKURA Y., SAKAGUCHI Z., SUZUKI M. & YAMAKAWA M. (2015). Broad-range detection of arboviruses belonging to Simbu serogroup lineage 1 and specific detection of Akabane, Aino and Peaton viruses by newly developed multiple TaqMan assays. *J. Virol. Methods.*, **225**, 9–15.
- SUDEEP A.B., JADI R.S. & MISHRA A.C. (2009). Ganjam virus. *Indian J. Med. Res.*, **130**, 514–519. Epub 2010/01/22. PubMed PMID: 20090098.
- TSUDA T., YOSHIDA K., OHASHI S., YANASE T., SUEYOSHI M., KAMIMURA S., MISUMI K., HAMANA K., SAKAMOTO H. & YAMAKAWA M. (2004a). 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. (2004b). Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the antibodies specific to akabane virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **16**, 571–576.
- UEHLINGER F.D., WILKINS W., GODSON D.L. & DREBOT M.A. (2018). Seroprevalence of Cache Valley virus and related viruses in sheep and other livestock from Saskatchewan, Canada. *Can. Vet. J.*, **59**, 413–418.
- 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.

- VENGUST G., VENGUŠT D.Z., TOPLAK I., RIHTARIČ D. & KUCHAR U. (2020). Post-epidemic investigation of Schmallenberg virus in wild ruminants in Slovenia. *Transbound. Emerg. Dis.*, **67**, 1708–1715 <https://doi.org/10.1111/tbed.13495>
- WADDELL L., PACHAL N., MASCARENHAS M., GREIG J., HARDING S., YOUNG I. & WILHELM B. (2019). Cache Valley virus: A scoping review of the global evidence. *Zoonoses Public Health*, **66**, 739–758. doi: 10.1111/zph.12621.
- 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.
- WERNIKE K. & BEER M. (2020). Schmallenberg virus: To vaccinate, or not to vaccinate? *Vaccines (Basel)*, **8**, 287.
- WERNIKE K., ESCHBAUMER M., SCHIRMEIER H., BLOHM U., BREITHAUPT A., HOFFMANN B. & BEER M. (2013). Oral exposure, reinfection and cellular immunity to Schmallenberg 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 Schmallenberg virus. *Arch. Virol.*, **157**, 1611–1616.
- YANG D.K., KIM Y.H., KIM B.H., KWEON C.H., YOON S.S., SONG J.Y. & LEE S.H. (2008). Characterization of Akabane virus (KV0505) from cattle in Korea. *Korean J. Vet. Res.*, **48**, 61–66.
- YANG L., ZHAO Z., HOU G., ZHANG C., LIU J., XU L., LI W., TAN Z., TU C. & HE B. (2019). Genomes and seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus and Nairobi sheep disease virus in *Haemaphysalis longicornis* ticks and goats in Hubei, China. *Virology*, **529**, 234–245. Epub 2019/02/10. doi: 10.1016/j.virol.2019.01.026.
- YILDIRIM Y., GÖKÇE G., KIRMIZIGÜL A.H., ERKILIÇ E.E., YILMAZ V., TAN M.T. & ÖZGÜNLÜK İ. (2015). Molecular and Serological Investigation of Akabane Virus Infection in Cattle in Kars-Turkey. *Israel J. Vet. Med.*, **70**, 52–57.
- 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 sobre el virus Schmallenberg, diríjase 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 2023.