

SECCIÓN 3.6.

LAGOMORPHA

CAPÍTULO 3.6.1.

MIXOMATOSIS

RESUMEN

Definición de la enfermedad: La mixomatosis es una enfermedad vírica generalizada y letal del conejo común (*Oryctolagus cuniculus*) causada por el virus Myxoma (VMIX), miembro de la familia Poxviridae. Los hospedadores naturales son dos lepóridos: *Sylvilagus brasiliensis* en Sudamérica (cepas sudamericanas), y *S. bachmani* (cepas californianas) en California, EE.UU. Sin embargo, tras introducciones intencionadas en Australia y Europa como mecanismo de control biológico de conejos comunes salvajes, actualmente el VMIX tiene una distribución mundial, es endémico en poblaciones de conejo común salvaje y puede transmitirse a conejos de producción, de laboratorio o criados como mascota. Hasta ahora, la mixomatosis sigue siendo la principal amenaza infecciosa para la cunicultura.

Descripción de la enfermedad: La mixomatosis es básicamente una enfermedad del conejo común. La liebre común (*Lepus europaeus*) es susceptible a la infección por el VMIX, pero casi nunca desarrolla una enfermedad generalizada. *Sylvilagus* spp. es bastante resistente y puede actuar como portador sano. No existe riesgo sanitario para el ser humano. En el conejo, se observan dos formas de enfermedad: la forma nodular (clásica), que se caracteriza por lesiones cutáneas mixomatosas macroscópicas, y la forma amixomatosa (respiratoria), en la cual los signos son principalmente respiratorios y los nódulos son pequeños y escasos. La forma nodular está causada por cepas virulentas del VMIX, se trasmite de forma natural por la picadura de insectos, sobre todo durante el verano, y se observa principalmente en conejos salvajes y mascota, y en explotaciones cunícolas pequeñas. Durante la infección por el VMIX, las abundantes proteínas inmunomoduladoras inducen progresivamente el colapso del sistema inmunitario del hospedador. Ello favorece las infecciones bacterianas en el tracto respiratorio, lo cual contribuye en gran medida a la muerte del animal. Desde la introducción del VMIX en poblaciones de conejos, han surgido cepas del virus con distintos grados de patogenicidad, y circulan en el campo. Las cepas leves y atenuadas causan la forma amixomatosa (respiratoria) de la enfermedad, sobre todo en animales de producción. Los conejos salvajes actúan como reservorios, mientras que los mosquitos y las pulgas pueden transmitir el virus a conejos domésticos, pero en el caso de una gran proximidad entre los animales (es decir, en conejos de producción), el virus también se puede transmitir por contacto directo. El semen que se utiliza durante la inseminación artificial también puede constituir un riesgo. No existe predilección de edad ni de sexo.

Identificación del agente: El diagnóstico de la mixomatosis, independientemente de su forma clínica, se basa en el aislamiento e identificación del virus o la detección de sus antígenos.

Cuando se hallan lesiones cutáneas en un conejo muerto, el antígeno vírico puede detectarse mediante métodos de diagnóstico rápido, como la inmunodifusión en gel de agar (AGID), la microscopía electrónica de tinción negativa (nsEM), la prueba de la inmunofluorescencia (FAT), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la histopatología. En monocapas de cultivo de células renales de conejo inoculadas con material de la lesión se observarán los efectos citopáticos característicos de los poxvirus. La presencia de virus se puede confirmar mediante la prueba de la inmunoperoxidasa en monocapa, la FAT, la PCR o la nsEM.

Pruebas serológicas: la presencia de una respuesta inmunitaria humoral manifiesta facilita un diagnóstico retrospectivo de la enfermedad, y puede ser indicativa de la prevalencia de la infección en una población de conejos. La serología también podría utilizarse para evaluar la vacunación incluso cuando no hay una correlación directa entre los títulos de anticuerpos anti-VMIX y el grado de protección de los animales frente a la enfermedad. La identificación y titulación de los anticuerpos específicos que se generan a partir de una infección natural o de una vacunación se realiza principalmente mediante enzoinmunoanálisis. También puede utilizarse la IFA o la AGID, pero son menos sensibles.

Requisitos para las vacunas: Para la vacunación de conejos se dispone de vacunas preparadas con virus vivo modificado del fibroma de Shope, o bien con cepas de virus Myxoma modificados.

A. INTRODUCCIÓN

La mixomatosis es una enfermedad vírica importante del conejo común (*Oryctolagus cuniculus*), tanto doméstico como salvaje, causada por el virus *Myxoma* (VMIX), un poxvirus (familia *Poxviridae*, subfamilia *Chordopoxvirinae*; género *Leporipoxvirus*) que fue aislado por primera vez en 1898 de una colonia de conejos de laboratorio de Uruguay. El ADN del VMIX codifica alrededor de 170 genes, entre los cuales, alrededor de 70 codifican factores inmunomoduladores e interactivos del hospedador que intervienen en la alteración del sistema inmunitario del hospedador y otras respuestas antivíricas.

Los hospedadores naturales son dos especies de lepóridos: *Sylvilagus brasiliensis* en Sudamérica (cepas sudamericanas) y *Sylvilagus bachmani* (cepas californianas) en California, EE.UU. (Fenner, 1994), en las cuales las cepas víricas producen solo un fibroma benigno. Tras las introducciones intencionadas en Australia y Europa como control biológico del conejo común salvaje, ahora el VMIX tiene una distribución mundial, es endémico en poblaciones de conejo común salvaje, y puede transmitirse a conejos de producción, de laboratorio o criados como mascotas (Fenner & Fantini, 1999). Las liebres comunes pueden desarrollar la enfermedad generalizada, pero lo hacen con muy poca frecuencia (Fenner & Ratcliffe, 1965). Los conejos salvajes actúan como reservorios, y los insectos (principalmente mosquitos y pulgas, pero también quiromónidos y piojos) pueden transmitir el virus a conejos domésticos. Cuando existe una gran proximidad entre los animales (es decir, conejos de producción), el virus también se puede transmitir por contacto directo. El VMIX se excreta con las secreciones oculares y nasales, o por las lesiones cutáneas, y también puede haberlo en el semen y secreciones genitales. No existe predilección de edad ni sexo.

Se han identificado dos formas de la enfermedad: la forma nodular (clásica) y la forma amixomatosa (respiratoria). La mixomatosis nodular se transmite de forma natural por picaduras de insectos y se observa principalmente en conejos salvajes y mascota, y en explotaciones cunícolas pequeñas. Se caracteriza por lesiones cutáneas rubicundas y una disfunción inmunitaria intensa, que cursan con infecciones bacterianas secundarias por microorganismos procedentes del tracto respiratorio. Se han diseñado cepas víricas prototípicas derivadas de los brotes australianos y europeos que caracterizan los distintos grados de virulencia (desde el grado I al grado V), observados en conejos de laboratorio (Fenner & Ratcliffe, 1965). Tras la infección por la cepa de grado I (la más virulenta), el primer signo de la infección es un abultamiento en el lugar de la misma, que aumenta de tamaño y normalmente se convierte en protuberancia y se ulcera. Va apareciendo progresivamente una blefaroconjuntivitis aguda y una hinchazón edematosa de la zona genital. Al sexto o séptimo día aparecen las lesiones secundarias (Fenner, 1994). La muerte se produce entre el octavo y quinceavo día después de la infección. Tras la infección por cepas de los grados II al V, los signos son por lo general los mismos, con la excepción de que se desarrollan más lentamente y son menos graves. Cuando los animales sobreviven, las lesiones se curan poco a poco. La tasa de mortalidad oscila entre el 20 y el 100%, dependiendo del grado de virulencia de la cepa vírica. En los conejos que sobreviven más allá del día 10–14 post-infección es habitual observar infecciones bacterianas secundarias (especialmente por *Pasteurella* sp. y *Bordetella* sp.) de las conjuntivas, las vías respiratorias altas y los pulmones, lo cual puede ser la principal causa de muerte en los conejos infectados con cepas subagudas del VMIX.

Los signos clínicos de la forma amixomatosa de la mixomatosis son principalmente respiratorios: fiebre y lesiones cutáneas más pequeñas que en la forma nodular, aunque muchos de los signos clínicos son característicos de la mixomatosis, como la lesión cutánea en el punto de inoculación, edema perineal, hinchazón palpebral, blefaroconjuntivitis y rinitis. La forma amixomatosa se considera más destacable en los conejos de producción. La base genética del fenotipo amixomatoso no se ha definido, pero se ha sugerido que la forma amixomatosa constituye una adaptación a la transmisión por contacto en ausencia de vectores, supuestamente por las secreciones respiratorias y conjuntivales, ya que para la transmisión es necesario el contacto directo. La virulencia de los virus amixomatosos parece depender de la presencia de bacterias patógenas, como *Pasteurella multocida* (Marlier *et al.*, 2000). Hasta ahora, esta forma se ha observado con frecuencia en países europeos en los que hay una considerable producción cunícola (como Francia, España, Bélgica e Italia).

No existe riesgo conocido de infección por el VMIX en el ser humano. Las medidas de biocontención deben determinarse a partir de un análisis 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*.

Los signos clínicos de la mixomatosis clásica están bastante bien definidos, aunque las infecciones bacterianas de las vías respiratorias altas y la conjuntivitis/queratoconjuntivitis bacteriana pueden causar confusión y errores en el diagnóstico. El virus del fibroma de Shope (VFS) causa una lesión local fibromatosa simple que debe diferenciarse del VMIX.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

El envío de muestras para el diagnóstico en el laboratorio es muy importante, porque los signos de la enfermedad se hacen menos reconocibles a medida que se atenúan las cepas de virus. Es más, se limita claramente la expresión del ectodermotropismo de las cepas amixomatosas del VMIX, de tal modo que el diagnóstico clínico de la forma amixomatosa es mucho más difícil que el de la forma clásica. La capacidad de distinguir el VMIX en lesiones mixomatosas típicas, en edema palpebral o en el edema genital varía en función de cada técnica. Sin embargo, para el diagnóstico de la mixomatosis típica atenuada o de las formas atípicas (amixomatosas) puede ser necesario el aislamiento vírico mediante la inoculación de líneas celulares sensibles, como la RK-13 (riñón de conejo), y la identificación del virus mediante métodos inmunológicos. En ambos casos, el agente también se puede identificar más rápida y fácilmente por detección del ácido nucleico del VMIX. El uso de técnicas moleculares para el diagnóstico ha aumentado progresivamente en los últimos años. Estos métodos pueden revelar una infección subclínica (por ejemplo, al analizar hisopos conjuntivales) y permitir la diferenciación entre cepas vacunales y naturales (Cavadini *et al.*, 2010).

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente¹						
nsEM	–	–	–	++	–	–
Histopatología e inmunotinción	–	–	–	++	–	–
Aislamiento del virus (cultivo celular)	–	+	–	+++	–	–
AGID	+	+	+	–	–	–
FAT	+	++	–	+	–	–
IPMA	+	+	–	++	–	–
PCR	++	+++	++	++	–	–
Detección de la respuesta inmunitaria						
I-ELISA	++	+++	+++	++	+++	+++
C-ELISA	++	+++	+++	++	+++	+++

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

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
IFA	+	+	+	–	++	++
AGID	+	+	+	–	+	++

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito.

Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido validadas formalmente, su uso sistemático y hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hace aceptables.

nsEM = microscopía electrónica con tinción negativa; AGID = Inmunodifusión en gel de agar; FAT = inmunofluorescencia; IPMA = inmunoperoxidasa en monocapa; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; ELISA = enzimoimmunoanálisis (I = indirecto; C = de competición); IFA = inmunofluorescencia indirecta.

1. Identificación del agente

En el caso de la forma clásica de la enfermedad, la identificación del VMIX puede intentarse con muestras de lesiones cutáneas (mixomas), de párpados, de la mucosa genital o de órganos internos (pulmones, hígado, bazo, riñón, etc.). Los mixomas se extirpan con tijeras y se separan de la epidermis y de la dermis superficial. Las muestras de tejido (tejidos nodular y cutáneo, partes de órganos y raspados de mucosa), se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS) con antibióticos, como se indica más adelante, y se tritura o se homogeniza por medios mecánicos a una dilución 1 g de tejido/4.5–9,0 ml de PBS o de agua destilada estéril (dH₂O). Las células se lisan con dos ciclos de congelación-descongelación, o por ultrasonificación para liberar los viriones y los antígenos víricos. Esta suspensión se centrifuga a 1.500 **g** durante 5–10 minutos. El sobrenadante líquido es el material utilizado en las pruebas.

En el caso de la forma respiratoria amixomatosa de la enfermedad, pueden utilizarse hisopos nasales y conjuntivales para la identificación del virus. Los hisopos se introducen en un tubo que contenga unos 0,3 ml de dH₂O estéril y se dejan empapar durante 10–15 minutos; los posibles restos de muestra que queden en el hisopo de algodón se liberan directamente al dH₂O con un palito aplicador de madera.

1.1. Microscopía electrónica

Puede aplicarse la microscopía electrónica de tinción negativa (nsEM) a una porción de lesión cutánea (mixomas), o a muestras de párpados, mucosa genital o hisopos conjuntivales y nasales, así como a muestras de pulmón. Es una técnica sencilla (método de la gota) y rápida de realizar, y los resultados se obtienen en 1 hora.

Se deposita una gota de la suspensión de tejido en un vidrio de reloj, y encima de la gota se coloca una cuadrícula de cobre con malla de 200/400 recubierta de plástico/carbono, y se deja absorber durante 10 minutos. El exceso de líquido se retira con papel absorbente y la cuadrícula se deposita sobre una gota de tinción durante unos 30 segundos. Para la tinción, puede utilizarse una solución acuosa al 2% de molibdato de amonio, pH 7,0, o ácido fosfotúngstico al 2% (PTA), pH 7,0. El exceso de líquido se retira con papel absorbente y la cuadrícula está lista para el examen al microscopio electrónico (ME). Si se observan partículas típicas de poxvirus, el resultado es positivo, pero por este método el VMIX no puede distinguirse del VFS.

1.2. Histopatología

El examen histopatológico de lesiones cutáneas, fijadas en formalina tamponada al 10% e incluidas en parafina, muestra que los grandes bultos de la piel principalmente se deben a una acumulación de material mucínico con destrucción de la estructura del tejido conjuntivo de la dermis, y no a una intensa proliferación celular (Marcato & Rosmini, 1986). La dermis y la epidermis resultan invadidas por granulocitos y células reticuloendoteliales aumentadas de tamaño y en forma de estrella, con un núcleo grande y citoplasma abundante, denominadas “células de mixoma”. Estas células destruyen el endotelio de vasos pequeños causando extravasación de eritrocitos; también se replican en el bazo y en los ganglios linfáticos causando una pérdida completa de linfocitos tanto B como T. Tras la fase

virémica, el virus se disemina por todo el organismo y causa lesiones genitales y viscerales, principalmente congestivas y con daños vasculares. En el pulmón, las lesiones son de intensidad variable, y las lesiones epidérmicas características también se observan en el epitelio bronquial (Joubert, 1973). Las lesiones microscópicas pueden variar en función de la virulencia de las cepas y del tipo de animales, es decir, según si son conejos salvajes o de laboratorio (Best *et al.*, 2000).

Los tejidos fijados también pueden teñirse mediante inmunotinción empleando el método del complejo avidina-biotina (ABC) peroxidasa. En primer lugar, los cortes se desparafinan en xileno y alcohol, se aplica una tinción de contraste con hematoxilina durante 1 minuto y se enjuagan en agua de grifo. A continuación, se sumergen en un baño de metanol que contenga un 3% de H₂O₂ y se lavan en PBS tres veces durante 5 minutos cada vez. Para reducir la interferencia del fondo causada por la unión de anticuerpos inespecíficos, las muestras se incuban con suero de conejo normal durante 1 hora a temperatura ambiente antes de añadir la biotina. Los portos se incuban durante toda una noche en una cámara húmeda a temperatura ambiente con suero anti-VMIX biotinilado o anticuerpos monoclonales (MAb), se lavan como antes y se incuban de nuevo durante 30 minutos a 37°C con una ABC peroxidasa. A continuación, se lavan tres veces. Se utiliza amino-etil-carbazol como sustrato. Por último, se lavan en agua de grifo y se montan.

1.3. Cultivo *in-vitro* – cultivo celular

El aislamiento del virus en cultivo celular se realiza utilizando cultivos primarios de células de riñón de conejo (RK), o líneas celulares establecidas, como la RK-13 o la SIRC (córnea de conejo del *Statens Serum Institut*) o bien otras líneas celulares de mamífero, como Vero (riñón de mono verde africano) o BGMK (riñón de mono verde y búfalo), en medio mínimo esencial (MEM) que contenga un 2% de suero de ternero, 300 unidades internacionales (UI)/ ml de penicilina, 300 µg/ml de estreptomycin, 100 µg/ml de gentamicina, 50 UI/ml de nistatina (micostatina) y 5 µg/ml de anfotericina (fungizona). El inóculo es el sobrenadante de una lesión homogeneizada o una secreción óculo-respiratoria (incluido el hisopo conjuntival preparado como se describe arriba) en medio MEM con un 2% de suero de ternero y antibióticos. El medio se elimina de la capa celular después de 2 horas. La capa celular se lava con un pequeño volumen de medio y luego se rellena con medio de mantenimiento (MEM). Los cultivos se incuban a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂.

El efecto citopático (ECP) característico de los poxvirus (Joubert, 1973) se desarrolla por lo general en 24–48 horas, pero con algunas cepas, según su virulencia, se tarda hasta 7 días en observar el ECP. Dependiendo de la cepa del virus, los grupos de células con un citoplasma confluyente forman sincitios cuyo tamaño varía de 2 a 50, o incluso a 100, núcleos juntos. Los núcleos de algunas células cambian, y la cromatina forma agrupaciones basófilas que varían en número y tamaño y dan al cultivo un aspecto de piel de leopardo. Si se presentan inclusiones intracitoplásmicas eosinófilas, estas son escasas. Las células afectadas se redondean, se contraen y se vuelven picnóticas. Se lisan y llegan a despegarse del soporte de vidrio o de plástico. Más tarde, todas las células están afectadas y la monocapa celular se despegar por completo.

El VFS produce al principio masas voluminosas y bien definidas de células redondeadas, que se multiplican y amontonan (Joubert, 1973). Por el borde, las células recién infectadas presentan alteraciones nucleares bien definidas e inclusiones citoplásmicas eosinófilas que son muy numerosas en los primeros estadios. La capa celular resulta destruida al cabo de varios días.

Además de la observación del ECP, para confirmar el aislamiento del virus en cultivo celular pueden utilizarse otros métodos, como la nsEM (véase el apartado B.1.1), la FAT (véase el apartado B.1.5.2), la IPMA (véase el apartado B.1.5.4) y la PCR (véase el apartado B.1.6).

1.4. Cultivo *in-vivo*

1.4.1. Huevos embrionados

El VMIX y el VFS pueden cultivarse en la membrana corioalantoidea de huevos de gallina embrionados. Se inoculan por vía corioalantoidea huevos de 11 días de vida y se incuban a 35°C durante 3 días. En caso de crecimiento vírico, tras extraer y lavar la membrana se observarán unas marcas específicas al microscopio.

1.4.2. Inoculación en animales

La inoculación intradérmica en conejos no se recomienda como herramienta de diagnóstico. Sin embargo, puede utilizarse si es necesario caracterizar la patogenicidad (el grado de virulencia, y si se trata de una forma clásica o amixomatosa) o para distinguir entre el VFS y el

VMIX. Los conejos deben ser de una raza doméstica, pesar unos 2 kg, no estar vacunados y haber sido previamente analizados para comprobar que no tienen anticuerpos (Joubert, 1973).

El inóculo puede ser el líquido sobrenadante de una lesión homogeneizada (con antibióticos) o el producto de un cultivo celular. Se administran 0,1–0,2 ml por vía intradérmica detrás de la oreja o en la región dorso-lumbar, que previamente se habrán afeitado. El inóculo se puede probar inyectando diluciones seriadas en tampón salino en un punto distinto para cada dilución. Aparecerá una lesión primaria en dichos puntos a los 2–5 días, seguida de conjuntivitis. Empleando cinco puntos para cada dilución se puede calcular la dosis infectiva 50% (DI₅₀). Si el animal sobrevive, la enfermedad puede confirmarse serológicamente pasados 15 días.

1.5. Detección de antígeno – técnicas de inmunomarcaje

1.5.1. Inmunodifusión en gel de agar (AGID)

La inmunodifusión en gel de agar (IGDA) (Sobey *et al.*, 1966) es una prueba cualitativa que permite detectar antígenos y anticuerpos. Es simple y rápida de realizar – con resultados que pueden obtenerse en 24 horas. Las placas de agar se preparan con agar Noble (0.6 g), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (2,5 g), cloruro sódico (4,5 g), y agua destilada (500 ml) que contenga tiomerosal (mertiolato) a una dilución de 1/100.000. El antisuero estándar (véase abajo 2.c.), y las muestras problema se colocan en pocillos opuestos de 6 mm de diámetro y separados 5 mm. Otra técnica consiste en depositar directamente un pequeño trozo de la lesión en el agar, a 5 mm de un disco de papel de filtro impregnado con el antisuero. En 48 horas aparecen normalmente varias líneas de precipitación, normalmente un máximo de tres, que indican la presencia de los antígenos del virus causante del mixoma. En presencia de reacciones heterólogas con el VFS, solo se forma una línea.

1.5.2. Inmunofluorescencia (FAT)

Puede aplicarse una inmunotinción directamente a cortes de tejido crioprotectados y fijados en metanol, incubándolos durante 1 hora con suero de anticuerpos anti-VMIX conjugados a fluoresceína o con MAb. Se puede detectar fluorescencia específica en las lesiones cutáneas, en los párpados, en los pulmones, en el bazo, en el hígado, en el riñón o en la mucosa genital. Se ha descrito una prueba FAT *in-vivo* sobre improntas de células de córnea, párpado y conjuntivales (FAT-ET) (Cancellotti *et al.*, 1986). La DIF-ET se lleva a cabo con un porta de vidrio que se aplica ejerciendo una suave presión contra la superficie del ojo. De esta forma, se adhieren células de la córnea, el párpado y la conjuntiva al vidrio y pueden teñirse y observarse.

1.5.3. Inmunofluorescencia indirecta (IFA)

Las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFA) se pueden aplicar a los cultivos a partir de las 24 horas. La IFA revela la multiplicación intracitoplásmica del virus, pero no permite distinguir entre el VMIX y el VFS. La inoculación de células de embrión de pollo (tripsinizadas a los 11 días de incubación del huevo) no origina ECP, pero resulta útil para detectar los antígenos víricos mediante IFA.

1.5.4. Prueba de la inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA)

Esta prueba se puede utilizar para identificar células infectadas por el VMIX. Se siembran células RK-13 en una placa de 6 pocillos (véase el apartado 2.1.1.ii). Cuando están listas, se inoculan las muestras, una por pocillo, y la placa se incuba como se describe en el apartado B.2.3.1. Se fijan las células con una solución de acetona fría al 80% durante 5–10 minutos, y a continuación se secan al aire. Las células se incuban con PBS con un 0,3% de H₂O₂ durante 10 minutos a temperatura ambiente para extinguir la peroxidasa endógena. Se lavan en PBS dos veces durante 5 minutos cada vez. Se incuban 1 hora a 37 °C con suero inmune anti-VMIX generado en conejo y previamente titulado o MAb específicos en PBS que contenga un 1% de BSA. Se lavan en PBS tres veces durante 5 minutos cada vez. Se incuban 1 hora a 37 °C con una solución de IgG anti IgG de conejo (o de ratón) conjugada a peroxidasa de rábano previamente titulada. Se lavan en PBS cuatro veces durante 5 minutos cada vez. Se tiñen con solución de diaminobencidina (DAB) (DAB al 0,05%, Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, 0,01% de H₂O₂ (acabado de preparar) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavan con agua del grifo durante 3 minutos. Las células infectadas son claramente visibles en un microscopio invertido; son células que se tiñen de marrón.

1.6. Métodos moleculares – detección de ácido nucleico

Para amplificar fragmentos genómicos del VMIX puede utilizarse la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Cavadini *et al.*, 2010) o la PCR en tiempo real (Albini *et al.*, 2012; Belsham *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 2013) a partir de material de diagnóstico, como mixomas palpebrales, óticos y nasales, costras y/o lesiones pulmonares, así como hisopos nasales y conjuntivales o semen.

Para detectar cepas vacunales, también pueden utilizarse la PCR y la PCR-RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) (cepa Borghi y cepa SG33) (Camus-Bouclainville *et al.*, 2011; Cavadini *et al.*, 2010).

La purificación del ADN total es un requisito para lograr una sensibilidad óptima. Se comercializan distintos métodos de purificación, adecuados para la prueba. Deben aplicarse precauciones especiales durante todos los pasos para minimizar el riesgo de contaminación.

Los procedimientos aquí descritos en detalle son modificaciones de los propuestos por Cavadini *et al.* (2010). La PCR consiste en tres procedimientos sucesivos: (1) extracción de ADN de las muestras problema y control, seguida de (2) amplificación por PCR, y (3) detección de los productos de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.

1.6.1. Extracción de ADN del virus

- i) Se homogeneiza ~1 g de muestra (mixomas palpebrales, óticos y nasales, costras y/o lesiones pulmonares) en 9 ml de PBS 1X con un homogeneizador manual o eléctrico, durante 15 minutos a 4°C a baja velocidad, ~2000 **g**.
- ii) Se añaden 100 µl de sobrenadante a 100 µl de tampón de lisis (Tris/HCl 50 mM, pH 8, Na₂ EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, dodecilsulfato de sodio [SDS] al 0.5%) más 12 µl de proteinasa K (reserva de 20 mg/ml, concentración final de 1,2 mg/ml) y se incuba 2 horas a 45°C (modificado por Stuart, 2004).
- iii) Para inactivar la proteinasa K, el homogenado se desnatura durante 10 minutos a 94°C y se centrifuga a 12.000 **g** durante 1 minuto.
- iv) El sobrenadante resultante se transfiere a un tubo nuevo y se añade un volumen igual de fenol:cloroformo:isoamil (25:24:1); la mezcla se somete al vórtex, se centrifuga durante 10 minutos a 12.000 **g** y la fase superior se transfiere a un tubo nuevo.
- v) Para precipitar el ADN, se añaden 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M (pH 5,2) y dos volúmenes de etanol absoluto y la mezcla se incuba a -20°C toda una noche o durante menos tiempo a -80°C (por ejemplo, 20–30 minutos).
- vi) Se recupera el ADN precipitado por centrifugación a 12.000 **g** durante 5–15 minutos a 4°C.
- vii) Se retira el etanol con cuidado y se lava el precipitado con 1 ml de etanol al 70% (v/v).
- viii) El ADN seco puede volver a suspenderse en 1 ml de tampón TE (Tris/Cl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM) y se guarda a 4°C en las posteriores manipulaciones o a -20°C si el almacenamiento va a ser largo.
- ix) En cada sesión deben añadirse un control negativo (100 µl de PBS) y uno positivo (100 µl de homogenado procedente de un conejo positivo).

1.6.2. Amplificación por PCR y detección del virus *Myxoma* en gel de agarosa

- i) El ADN extraído se amplifica mediante PCR empleando los siguientes cebadores:
M071-F: 5'-ACC-CGC-CAA-GAA-CCA-CAG-TAG-T-3' (67,229nt -67,250nt)
M071-R: 5'-TAA-CGC-GAG-GAA-TAT-CCT-GTA-CCA-3' (67,700nt -67,677nt) (Cavadini *et al.*, 2010).
- ii) La amplificación por PCR se lleva a cabo en 5 µl y el procedimiento y las condiciones se resumen en las Tablas 2 y 3.
- iii) En cada reacción de PCR deben añadirse un control negativo (agua sin DNasa) y un control positivo (5–10 ng de ADN previamente extraído y analizado procedente de un conejo positivo).

Tabla 2. Reactivos para la PCR

Reactivos	Concentración final	Volúmenes
ADN		5–10 ng
Tampón 5x	1x	5 µl
Cebador-F (20 pmol/µl)	0,4 pmol/µl	0,5 µl
Cebador-R (20 pmol/µl)	0,4 pmol/µl	0,5 µl
dNTP (cada una a una concentración de 2,5 mM)	0,2 mM	2 µl
BSA (1 mg/ml)	0,1 mg/ml	2,5 µl
Taq 5U/µl	0,04 U/µl	0,2 µl
H ₂ O sin DNasa		XX ²
Volumen final		25 µl

Tabla 3. Perfil térmico de la PCR

Pasos	Temperatura	Tiempo	N° de ciclos
Desnaturalización	95°C	5 minutos	1
Desnaturalización	95°C	30 segundos	40
Hibridación	60°C	30 segundos	
Extensión	72°C	40 segundos	
Extensión	72°C	7 minutos	1
	4°C	∞	1

- iv) Al final de la amplificación, se analizan 10 µl de la mezcla de reacción para la PCR en gel de agarosa al 2%; el resultado positivo es la presencia de una banda de 471 pb correspondiente a una parte del gen M071L diana en el control positivo. Si en el producto control negativo aparece banda, significará que durante el ajuste de la PCR se ha producido una contaminación cruzada y que la prueba debe repetirse.

1.6.3. Amplificación por PCR y detección de las cepas vacunales Borghi y SG33

- i) Para identificar cepas vacunales mediante PCR, se utilizan el siguiente par de cebadores:
- VAX-F: 5'-ACA-AGA-ATA-TAC-TAA-AGA-ATA-CCA-CG-3' (138,997nt–139,021nt)
- Borghi-R: 5'-TAG-CGC-GCA-TGG-CGA-CCC-TTG-GT-3' (139,398nt–139,420nt)
- específico de la cepa vacunal Borghi (tamaño del amplicón de 405 pb) y
- VAX-F: 5'-ACA-AGA-ATA-TAC-TAA-AGA-ATA-CCA-CG-3' (138,997nt–139,021nt)
- SG33-R: 5'-GAC-GTG-CAT-GGC-GAC-CCT-TTT-TGC-GTG-T-3'(139,398nt–139,419nt)
- específico de la cepa vacunal SG33 (tamaño del amplicón de 409 pb) (Cavadini *et al.*, 2010).
- ii) La amplificación y el análisis por PCR se ajustan como se ha descrito anteriormente, con la diferencia de que la temperatura del paso de la hibridación es de 56°C.

2. Pruebas serológicas

La infección de conejos con cepas del VMIX induce una respuesta inmunitaria fuerte y adaptativa que consiste en la producción de anticuerpos de tipo IgM e IgG (Kerr, 1997). Es algo que también ocurre en los casos de vacunación con vacuna viva o de infección por cepas del VMIX levemente patógenas, aunque los títulos de anticuerpos en estos casos son más bajos que los que inducen las cepas altamente patógenas. La IgM aparece

2 El volumen de H₂O depende del volumen de ADN que se haya utilizado en la reacción.

5-6 días post-infección y suele persistir 30-40 días, mientras que el pico de la IgG tiene lugar a los 20–30 días, y esta inmunoglobulina se sigue detectando durante al menos 2 años en conejos infectados de forma natural. En cuanto al valor del título de la dosis, pueden hallarse anticuerpos IgG contra el VMIX en conejos de corta edad hasta aproximadamente los 2 meses de edad. Como consecuencia, la serología para el VMIX es muy útil para la mayoría de propósitos indicados en la Tabla 1. No obstante, es importante tener en cuenta que la protección de los conejos frente a la mixomatosis depende más de la respuesta inmunitaria celular que de la humoral. Por ello, los títulos de anticuerpos anti-VMIX no constituyen un indicador directo del nivel de protección frente a la enfermedad. Por último, teniendo en cuenta el bajísimo grado de variación genética de las proteínas inmunodominantes del VMIX (es decir, la proteína inmunodominante de la envoltura – IMV – M071L), no pueden utilizarse pruebas serológicas para tipificar las distintas cepas naturales del VMIX.

Se han utilizado muchos métodos para detectar anticuerpos anti-VMIX en el suero, desde la inmunodifusión en gel de agar tradicional hasta los enzimoanálisis (ELISA) más recientes. Hasta ahora, los ELISA son la prueba preferida, por su simplicidad, rapidez, bajo coste y la alta sensibilidad y especificidad. La prueba de la fijación del complemento (CF) ya no se recomienda, debido a su baja sensibilidad (Gelfi *et al.*, 1999).

2.1. Enzimoanálisis indirecto (I-ELISA)

Se han desarrollado utilizado como pruebas serológicas para el VMIX dos ELISA indirectos (I-ELISA) muy similares, con el antígeno directamente depositado sobre la fase sólida. Los resultados del I-ELISA-1, descrito por Kerr (1997), se han comparado con los obtenidos en la prueba de neutralización, mientras que los obtenidos en el I-ELISA-2, desarrollado por Gelfi *et al.* (1999), se han comparado con la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFA) y con la CF. Ambos ELISA han dado rendimientos similares, siempre mejores que los de otros métodos serológicos.

2.1.1. I-ELISA-1 (Kerr, 1997)

- i) Preparación del antígeno
 - a) La cepa Lausanne (LU), aislada en Brasil en 1949, se considera *de facto* la cepa de VMIX de referencia a nivel internacional (código ATCC VR-115). Como alternativa, teniendo en cuenta el alto grado de estabilidad antigénica del VMIX, puede utilizarse una cepa altamente virulenta regional como referencia de laboratorio del VMIX. Este virus debe adaptarse al crecimiento *in vitro* para obtener reservas con títulos altos en 48-72 horas de incubación.
 - b) Las reservas del virus se cultivan en células RK-13 o SIRC en MEM suplementado con un 10% de suero de ternero, 200 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. La prueba de la formación de focos puede aplicarse para la titulación vírica, como se describe abajo. Las reservas de virus se dividen en alícuotas y se almacenan congeladas a –80°C.
 - c) Se cultivan viriones en células RK-13 o SIRC en frascos de cultivo tisular de 180 cm² empleando una multiplicidad de infección (moi) de 0,02-0,05 (alrededor de 1 virión infeccioso por cada 20–50 células cultivadas). Se infectan 6–12 frascos por cada preparación dejando crecer el virus hasta que se observa un ECP uniforme.
 - d) Se lavan las monocapas celulares dos veces con PBS, pH 7,2, se raspan las células del frasco y se precipitan por centrifugación (800 g durante 10 minutos a 4°C).
 - e) Se vuelven a suspender los precipitados en 5 ml de PBS fría y se sonicán para liberar el virus intracelular. Se digiere la suspensión con DNasa1 (25 µg/ml) y RNasa A (50 µg/ml) a 37°C durante 30 minutos con agitación frecuente.
 - f) Se precipitan los viriones mediante centrifugación (250.000 g, 20 minutos a 4°C) formando un gradiente discontinuo mediante el recubrimiento con un 10% de dextrano T10 y el mismo volumen de sacarosa al 36%, ambas soluciones en Tris/HCl 10 mM, pH 8,0, y EDTA 1 mM.
 - g) Se vuelve a suspender el precipitado en PBS fría en el volumen original y se repite el paso de precipitación anterior. A continuación, se vuelve a suspender el precipitado en 0.5–1,0 ml de PBS fría, se generan alícuotas y se guardan congeladas a –20°C como reserva de antígeno.
 - h) Para establecer la dilución a la cual utilizar el antígeno en el ELISA, se titula el antígeno reserva contra un suero de referencia positivo hasta producir una densidad óptica (OD) de 1,0 a una dilución sérica de 1/100. Este paso se lleva a cabo empleando el protocolo de ELISA indicado abajo.

- ii) Cuantificación de MYXV mediante la prueba de formación de focos (Smallwood et al., 2010)
- Se siembra una placa de cultivo tisular de seis pocillos con 1/5 del contenido de un frasco de cultivo tisular de 75 cm² casi confluyente (unas 2–4 10⁵ células) de células CV-1 (fibroblasto de riñón de mono verde africano) o bien células RK-13.
 - Se mezclan las células con MEM completo hasta un volumen final de 12 ml para sembrar cada uno de los seis pocillos. Se pipetea 2 ml en cada pocillo de la placa.
 - Se incuban a 37°C en una atmósfera de CO₂. Cuando las células presentan una confluencia del 80–90% (normalmente en 20–28 horas), se procede a la infección.
 - Antes de la infección, se comprueba si la preparación vírica presenta grumos. Si hay grumos, o se sospecha que los hay, se sonica la solución con un solo ciclo de 10–15 segundos. Durante la sonicación, se mantiene el tubo en hielo.
 - Se realizan diluciones decimales seriadas de virus en MEM completo empezando en 10⁻² a 10⁻⁸. Se eliminan los medios de la placa de seis pocillos y se añaden 0,5 ml de cada dilución a un solo pocillo.
 - Se incuba la placa a 37°C en una atmósfera de CO₂ para obtener la adsorción del virus a las células. Si no se dispone de una mecedora de plataforma dentro de la incubadora, cada 10 minutos debe mecerse suavemente la placa para redistribuir el líquido.
 - Pasada 1 hora, se añaden 1,5 ml de MEM completo a cada pocillo. Se incuba 2–5 días a 37°C en una atmósfera de CO₂.
 - Se aspiran los medios de los pocillos. Se añaden 0,4–0,5 ml de solución de cristal violeta (cristal violeta al 0,1% [p/v] disuelto en etanol al 20%) a cada pocillo, aplicándolo suavemente a lo largo del lateral de los pocillos para no eliminar células.
 - Se mece suavemente y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Se aspira la tinción y se invierte la placa para secar los pocillos.
 - En un microscopio invertido, se cuentan los focos de los pocillos que tienen < 100 (lo cual debe ser posible en al menos dos pocillos consecutivos).
 - Se calcula el título (UFF [unidades formadoras de focos]/ml): título = número de focos x dilución x 2.
- iii) Producción de sueros estándar de referencia de laboratorio
- Se utilizan conejos adultos (de 2–3 meses de edad) no vacunados contra la mixomatosis y procedentes de una explotación libre de mixomatosis.
- Sueros control positivos estándar: se vacunan contra la mixomatosis 3–5 conejos. Pasados 30 días, a estos conejos se les inocula una cepa virulenta de la mixomatosis (preferiblemente debe utilizarse la misma cepa que la que se usó para preparar el antígeno). Si se conoce el título vírico, se inoculan 100-200 unidades formadoras de placa (UFP) en 0,1 ml por vía intradérmica. El día 30 post-inoculación, se sacrifican los conejos, se obtienen muestras de sangre y se producen los sueros siguiendo el protocolo estándar.
 - Sueros control negativos estándar: se sacrifican 3–5 conejos, se obtienen muestras de sangre y se producen los sueros siguiendo el protocolo estándar.
- Los sueros se almacenan en alícuotas a –20°C.
- iv) Protocolo del ELISA
- Se utiliza una placa de ELISA de alta capacidad de fijación.
- Se recubre la placa (50 µl en PBS, pH 7,2) con el antígeno a la dilución predeterminada (véase arriba) y se incuba 2 horas a 37°C.
 - Se lava la placa con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en PBS (leche/PBS). Se bloquea la placa con leche/PBS toda una noche a 4°C.
 - Se distribuyen los sueros en la placa

- Identificación de sueros negativos y positivos: Se diluyen a 1/100 los sueros estándar y problema en leche/PBS y se añaden 50 µl por pocillo. Se dejan dos pocillos como blanco (es decir, se pipetea 50 µl solo de leche/PBS).
 - Determinación del título del suero: Todos los sueros se diluyen a la mitad empezando en una dilución a 1/100 directamente en la placa de ELISA empleando una pipeta multicanal. Se dejan dos pocillos como blanco (es decir, se pipetea 50 µl solo de leche/PBS).
- d) Se incuba la placa 2 horas a 37°C.
- e) Se lava tres veces con PBS y Tween 20 al 0,05% (PBS/Tween).
- f) Se añade anticuerpo anti-Ig de conejo conjugado a peroxidasa de rábano a la dilución indicada por el proveedor, en PBS/leche. Se incuba durante 30 minutos a 37°C.
- g) Se lava la placa seis veces con PBS/Tween.
- h) Se añaden 100 µl de sustrato (ABTS: 2,2-acino-bis 3-etilbenzotiazolina sulfonato) a 1 mg/ml más peróxido de hidrógeno al 0,06 %, en tampón citrato-fosfato 0,1 M a pH 4,0).
- i) Se incuba a temperatura ambiente y se lee la absorbancia a 405 nm empleando un espectrofotómetro lector de microplaca de ELISA.
- v) Interpretación de los resultados
- Antes de analizar los resultados del ELISA, se resta el valor medio de OD de los dos pocillos blanco al valor de OD de todos los sueros incluidos en la placa. Después de realizar esta resta, el valor de OD del suero control negativo debe ser inferior a 0,1 OD.
- a) Un suero se clasifica como negativo cuando da un valor de OD igual o inferior al de los sueros control negativos más 0,1 OD.
- b) Un suero se clasifica como positivo cuando da un valor de OD superior al valor de OD del suero negativo más 0,25 OD.
- c) Un suero con OD superior al valor de corte que define un resultado negativo, pero inferior al valor de corte que define un resultado positivo, se considera ambiguo o dudoso.

En el caso de la titulación de sueros positivos a punto final, el título corresponde a la última dilución con un valor de OD todavía positivo, que es una OD igual a la de los sueros control negativos a la dilución de 1/100 (a la cual siempre se habrá restado el valor de fondo) más 0,1 OD.

2.1.2. I-ELISA-2 (Gelfi *et al.*, 1999)

- i) Preparación del antígeno
- Este paso es muy similar al del I-ELISA-1 pero con las siguientes pequeñas diferencias.
- a) Las células RK-13 se cultivan en medio MEM suplementado con un 2% de suero de ternero.
- b) Las células infectadas se raspan, precipitan con una centrifugación a baja velocidad y se lavan una vez en Tris 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, pH 8,6 (TL20).
- c) Las células se suspenden en TL20, se dejan sobre hielo durante 90 minutos (o toda una noche) y se homogeneizan en un homogeneizador Dounce.
- d) Tras la clarificación del homogenado a 1.200 **g** durante 10 minutos a 4°C, se deposita una capa de 7–9 ml de sobrenadante sobre 2 ml de una base de sacarosa al 36% en TL20, y se ultracentrifuga a 200.000 **g** durante 2 horas.
- e) El precipitado se vuelve a suspender en tampón TL20 a razón de unos 0,5 ml en cada tubo. Se determina la concentración de proteína empleando un método colorimétrico (es decir, el método de Bradford o de BCA).
- ii) Producción de sueros estándar de referencia de laboratorio
- Este paso es idéntico al descrito para el I-ELISA-1

iii) Método del I-ELISA

Se utiliza una placa de ELISA de alta capacidad de fijación.

- a) Se recubre la placa con una dilución de 1 µg/ml de antígeno en PBS, pH 7,6, y se incuba toda una noche a 37°C.
- b) Se lava la placa tres veces con PBS y se bloquea por incubación en 15 mg/ml de gelatina en PBS durante 1 hora a 37°C.
- c) Se lava la placa tres veces en PBS/Tween 20 al 0,1%. Se preparan diluciones seriadas a la mitad de los sueros en PBS/Tween empezando con la dilución de 1/50. Entre los sueros deben incluirse los controles negativo y positivo. Se dejan dos pocillos solo con PBS en lugar de los sueros. Se incuba la placa durante 1 hora a 37°C.
- d) Se lava la placa tres veces en PBS/Tween. Se añade una solución en PBS/Tween de IgG de cabra anti IgG de conejo conjugada a fosfatasa alcalina, a la dilución indicada por el proveedor. Se incuba la placa durante 1 hora a 37°C.
- e) Se lava la placa cuatro veces con PBS-Tween. Se añade p-nitrofenolfosfato disódico a una concentración de 1 mg/ml en dietanolamina al 10%. Se guarda la placa a temperatura ambiente en la oscuridad durante 12 minutos y a continuación se detiene la reacción añadiendo NaOH 2N. Se leen los valores de absorbancia a 405 nm empleando un espectrofotómetro lector de microplaca de ELISA.

iv) Interpretación de los resultados

Se utiliza el valor de OD de los sueros control negativos como referencia para interpretar de los resultados. Este valor debe ser equivalente al valor medio de OD de los pocillos que contienen solo PBS. Los resultados se expresan como negativo o positivo a una dilución de suero específica. El título de la muestra de suero se expresa como la inversa de la dilución más alta a la cual el valor de OD es más de tres veces la absorbancia del suero control negativo. Las muestras de suero se consideran positivas a partir de 1/100.

2.1.3. Comentarios y sugerencias sobre el uso de los I-ELISA

Aunque hasta aquí se ha ofrecido información bastante detallada sobre los métodos, cada laboratorio debe estandarizarlos y validarlos en relación a las condiciones del lugar, y teniendo en cuenta la epidemiología de la enfermedad su zona. Además, el conjugado enzima-Ig de conejo a enzima es uno de los reactivos más críticos en cuanto a especificidad y sensibilidad de la reacción. Teniendo en cuenta que el rendimiento técnico del conjugado enzima-Ig puede variar en función de la empresa que lo suministre o del lote al cual pertenezca, será necesaria una nueva estandarización parcial en cada caso. Tal vez también se pueda mejorar la producción de antígeno (es decir, títulos más altos y mayor grado de purificación) utilizando métodos bien descritos (Smallwood *et al.*, 2010).

Aunque no se especifica en los métodos descritos arriba, los procedimientos de laboratorio también podrían incluir los siguientes pasos:

- i) Tras el paso de recubrimiento, las placas se guardan a -20°C en bolsas de plástico durante al menos 3 semanas.
- ii) Para reducir o, mejor, evitar la congelación y descongelación del antígeno, se añade glicerol al 50% a la preparación de antígeno que se vaya a almacenar a -20°C en estado líquido.

2.2. ELISA de competición (C-ELISA para el VMIX)

En el Laboratorio de Referencia de la OIE para la mixomatosis, las pruebas serológicas por rutina se llevan a cabo con un ELISA de competición (C-ELISA), en el cual se utiliza un MAb (1E5) que reconoce específicamente la proteína inmunodominante de la envoltura del VMIX (IMV – marco abierto de lectura M071L). Las principales características de este C-ELISA son las siguientes:

- i) la detección de todas las clases de inmunoglobulina anti-VMIX presentes en el suero,
- ii) mayor especificidad que el I-ELISA,
- iii) la especificidad aumenta aún más utilizando MAb 1E5 anti proteína IMV.

El Laboratorio de Referencia de la OIE puede suministrar los principales reactivos del C-ELISA para el VMIX en un formato de kit que incluye instrucciones detalladas sobre los métodos y la interpretación de los resultados.

2.3. Preparación de reactivos estándar para IGDA e IFA

2.3.1. Preparación del antígeno

El antígeno se produce a partir de cultivos celulares empleando la línea celular RK-13, como se describe arriba (apartado B.2.1.1.i). La monocapa se recoge unas 48 horas después de la infección, cuando las células muestran con claridad un ECP (80%), y se centrifuga (1.000 *g*). Se retiene el líquido sobrenadante. Las células infectadas se congelan y descongelan tres veces para liberar virus adicionales y la suspensión vírica se clarifica a 1.000 *g*. El sobrenadante recién recogido se añade al sobrenadante original. El sobrenadante final es el antígeno y se guarda a -20°C o -70°C (para conservación más duradera). Se titula en cultivos celulares antes de su utilización.

2.3.2. Producción de sueros estándar de referencia de laboratorio

Este paso es idéntico al que se describe para el I-ELISA (apartado B.2.1)

2.4. Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA)

La prueba IFI (Gilbert *et al.*, 1989) se realiza utilizando cultivos de células RK-13 en pocillos de fondo redondeado de placas de microtitulación:

2.4.1. Procedimiento analítico

- i) Se distribuye en todos los pocillos una suspensión celular, de 4×10^4 células diluidas en medio, y en 24 horas se forma una monocapa celular confluyente.
- ii) Se elimina el medio y se añaden a cada pocillo 100 μl de suspensión de virus (con una multiplicidad de infección de 0,05).
- iii) Después de 2 horas, se añaden 100 μl de medio esencial mínimo (MEM) que contenga 2% de suero de ternero.
- iv) Después de incubar 48 horas, se lavan las placas con PBS y se fijan con acetona que contenga etanol al 50% durante 30 minutos a -20°C o paraformaldehído (4% en PBS) a temperatura ambiente.
- v) Luego se secan las placas a 37°C durante 15 minutos. Las placas se pueden guardar a -30°C o -70°C durante 3 meses.
- vi) Los sueros se analizan por IFA utilizando anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a isotiocianato de fluoresceína.
- vii) Los resultados de la prueba pueden ser cualitativos con sueros diluidos 1/20, o cuantitativos con diluciones seriadas de suero.

2.5. Prueba de inmunodifusión en gel de agar

El agar se prepara como se ha descrito anteriormente (apartado B.1.5.1) empleando 6 ml por cada 10 cm de placa de Petri.

2.5.1. Procedimiento analítico

- i) Sobre la superficie del agar se colocan tiras de papel de filtro que contienen el antígeno estándar y el antisuero, y los discos que contienen el suero problema (los discos entre las tiras).
- ii) Las placas se incuban con atmósfera húmeda a 37°C y se leen a las 24–48 horas.
- iii) Deben aparecer tres líneas de precipitación. Si el suero problema contiene anticuerpos específicos frente al VMIX, por lo menos una de las tres líneas se curva hacia la banda de antígeno; en caso contrario, permanece recta. Si el suero contiene antígeno contra el VMIX, al menos una de las líneas se curva hacia la tira del suero estándar. También se puede realizar la prueba de una manera más convencional utilizando reactivos líquidos en pocillos cortados en el agar.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

Para vacunar contra la mixomatosis se han desarrollado dos tipos de vacunas vivas: vacunas heterólogas preparadas a partir del virus del fibroma de Shope (VFS) (Fenner & Woodrooffe, 1954; Shope, 1932), y una vacuna homóloga preparada a partir de cepas atenuadas del VMIX (Arguello Villares, 1986; Gorski & Mizak, 1985; Saurat *et al.*, 1978; Tozzini & Mani, 1975; Von Der Ahe *et al.*, 1981). Ambas se administran por vía subcutánea o intradérmica. Cada tipo de vacuna tiene sus ventajas y sus inconvenientes. Las vacunas preparadas con VFS pueden considerarse menos inmunógenas. Las vacunas vivas atenuadas contra el VMIX son más inmunógenas y confieren una protección más duradera, es decir, de unos 4-6 meses. No obstante, pueden ser inmunosupresoras, sobre todo en conejos de corta edad (Fenner & Woodrooffe, 1954; McKercher & Saito, 1964).

Se ha desarrollado una cepa recombinante del VMIX viva atenuada que expresa la proteína de la cápsida del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (VEHC) y que confiere protección doble contra la mixomatosis y el VEHC (Bertagnoli *et al.*, 1996) que se está comercializando en Europa (Spibey *et al.*, 2012). Una cepa de campo atenuada de MYXV de España (cepa 6918) se ha diseñado y probado de manera similar en estudios de campo y de laboratorio como una vacuna contra la mixomatosis y el VHDR para conejos salvajes (Angulo y Barcena, 2007).

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se indican en el capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las normas dadas aquí y en el capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden suplementarse con requisitos nacionales y regionales.

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

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

Se debe establecer un inóculo primario de virus (MSV) y utilizarlo de acuerdo con un sistema de lotes de inóculo. Se debe mantener un registro de su origen, historial de pases y características.

Los virus empleados para las vacunas son cepas atenuadas del VFS o del VMIX.

i) Vacuna heteróloga con virus del fibroma de Shope

Las cepas del VFS son, en general, la cepa OA original de Shope (1932), la cepa de Boerlage, la variante IA, u otras cepas estrechamente relacionadas. Las características antigénicas específicas de las cepas del VFS se verifican mediante AGID empleando sueros monoespecíficos contra el VFS y el VMIX.

Las cepas VFS se mantienen por pases en conejos libres de patógenos específicos (SPF) o en conejos no vacunados de poblaciones de las que se sabe que están libres de mixomatosis (negativas en pruebas serológicas). Se afeita la piel del dorso de conejos adultos sanos y se inocula en varios sitios con una suspensión de material virulento al 1%. Los fibromas están totalmente desarrollados a los 8–10 días, los conejos se sacrifican y los tumores se extraen asépticamente y se homogeneizan con agua destilada. La suspensión se guarda a -30°C o -70°C en glicerol al 50% tamponado, o como una dilución proteica al 5% (albúmina bovina). También es posible la producción VFS en líneas celulares dérmicas de conejo.

ii) Vacuna viva atenuada homóloga contra la mixomatosis

Las cepas del VMIX son cepas naturales atenuadas por pases seriados en huevos de gallina embrionados, células de riñón de conejo a temperaturas decrecientes, o células de embrión de pollo. Las cepas suelen ser el resultado de haber sido clonadas varias veces. A partir de una preparación de vacuna comercial se han obtenido distintas cepas atenuadas (MSD, SG33, Borghi, BT 84, MAV, Leon 162, Poxlap, Pisa, etc.).

La identidad del VMIX se confirma con la prueba de la neutralización, FAT o IPMA en células RK-13 u otras líneas celulares adecuadas, empleando un antisuero monoespecífico (producido por vacunación de conejos con la cepa vírica vacunal

específica). El VMIX también puede identificarse con métodos moleculares (es decir, PCR empleando cebadores específicos). De esta forma, también es posible caracterizar mejor las propiedades genómicas de la cepa vírica atenuada.

El VMIX se puede cultivar en cultivo de células de embrión de pollo obtenidas de parvadas libres de patógenos específicos, o bien en líneas celulares adecuadas (línea celular de dermis de conejo) y en células RK-13.

iii) Cepa recombinante viva atenuada del VMIX que expresa el VEHC

La vacuna se construye a partir de una cepa atenuada de laboratorio de virus de mixoma y el gen de la proteína de la cápsida de una cepa del VEHC (Bertagnoli *et al.*, 1996; Spibey *et al.*, 2012). Se utilizan métodos de laboratorio estándar para vacuna viva atenuada contra el VMIX y se inserta el gen de la cápsida del VEHC en el locus MGF/M11L del gen del virus Myxoma. El material de la vacuna se prepara en células de riñón de conejo (RK-13).

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

El inóculo primario debe estar libre de contaminación bacteriana, fúngica, micoplásmica y vírica. La pureza viene determinada por pruebas de gran variedad de contaminantes, es decir, virus extraños, bacterias, micoplasmas y hongos. Las pruebas de esterilidad y de ausencia de contaminación de los materiales biológicos deben realizarse de acuerdo con lo descrito en el Capítulo 1.1.4.

En particular, las pruebas de virus contaminantes se realizan inoculando una monocapa confluyente de células Vero. La vacuna, ajustada al equivalente de 20 dosis/ml, se neutraliza con un volumen igual de suero hiperinmune mono específico durante 30 minutos a 37°C. La mezcla se filtra a través de un filtro de membrana de 0,22 µm, y se inoculan volúmenes de 1 ml a 5 frascos de cultivo celular de 25 ml, que se mantienen en observación durante 7 días. Tras la recolección, las células se suspenden en medio y se someten a varios ciclos de congelación-descongelación, seguidos de una centrifugación y filtración, y el material se inocula en cultivos frescos y se observa durante 7 días. No debe haber indicios de ECP, y para excluir la presencia de VEHC, tampoco debe haber hemaglutinación de eritrocitos O humanos.

2.1.3. Validación como cepa vacunal

La prueba se lleva a cabo con cada vía de administración indicada. Se utilizan al menos 10 conejos, de la edad mínima recomendada para la vacunación y negativos a la mixomatosis según pruebas serológicas. Se administra, por una de las vías recomendadas, una cantidad de virus correspondiente a como mínimo 10 veces el título máximo esperable en una dosis de vacuna. Se observa a los conejos durante 28 días. Se registra la temperatura corporal el día previo a la vacunación, en el momento de la vacunación, 4 horas después de la vacunación y, a continuación, a diario durante 4 días; se anota el aumento máximo de temperatura de cada animal. No se producen reacciones locales ni sistémicas anómalas; el aumento medio de la temperatura no es superior a 1 °C y ningún animal presenta un aumento superior a 2°C. Puede producirse una reacción local que dure menos de 28 días.

Debe comprobarse la inocuidad de las cepas vacunales (tanto del VFS como del VMIX) que se utilicen para preparar la vacuna, tanto en hembras gestantes como en gazapos lactantes (véase el apartado C.2.3.2). Debe ser seguras también en otras especies (como cobayas, ratones adultos o liebres).

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

i) Vacuna heteróloga con virus del fibroma de Shope

La producción original de VFS se llevó a cabo mediante inoculaciones intradérmicas múltiples de virus inóculo en la piel del dorso de varios conejos. El producto de homogenado de fibroma puede almacenarse congelado o utilizarse de inmediato. Actualmente, se puede producir en línea celular de dermis de conejo, como la RK-13 (Jerabek, 1980). Tras la clarificación por centrifugación, el líquido sobrenadante se mezcla con un estabilizador que contenga antibióticos y se distribuye en frascos o botellas para su liofilización. Puede añadirse caolín como adyuvante (40 mg/ml) para reforzar la

intensidad y la duración de la inmunización, en cuyo caso la vacuna se administrará por vía subcutánea.

- ii) Vacuna homóloga viva atenuada contra la mixomatosis y vacuna viva atenuada recombinante contra VMIX+VEHC

El VMIX se propaga en una línea celular adecuada (como la RK-13). El virus se recolecta pasados 2–6 días. La suspensión vírica puede guardarse a -70°C . La vacuna se prepara mediante la dilución, a unas proporciones especificadas, de la preparación vírica con un estabilizador para liofilización. Tras la homogeneización, el producto se distribuye en frascos de liofilización, que se sellan aplicando vacío o en nitrógeno estéril.

2.2.2. Control durante el proceso

La potencia del lote se determina midiendo el contenido en virus. Se inoculan diluciones seriadas de la vacuna (VFS o VMIX) en cultivos celulares adecuados. Una dosis de vacuna deberá contener al menos el título mínimo previamente establecido. Si la cepa vacunal no está adaptada a los cultivos, deberá realizarse una prueba de eficacia en conejos (véase el apartado C.2.3.3).

- i) Vacuna heteróloga con virus del fibroma de Shope

El título del VFS antes se medía *in vitro* calculando la DI_{50} tras la inoculación intradérmica de diluciones seriadas del líquido sobrenadante clarificado en varios puntos (por ejemplo, cinco) a un máximo de seis conejos. También se inoculaba una dilución de una preparación estándar del VFS a cada conejo para confirmar si la respuesta del animal a la inoculación era correcta.

La titulación también se puede realizar en células RK-13 ($DICT_{50}$).

- ii) Vacuna homóloga viva atenuada contra la mixomatosis y vacuna viva atenuada recombinante contra el VMIX+VEHC

La titulación del VMIX se puede realizar en células RK-13 células ($DICT_{50}$).

En cada caso, el título debe correlacionarse con la potencia requerida, como define la prueba de potencia del lote, véase el apartado C.2.3.3.

2.2.3. Pruebas en lotes de producto final

- i) Esterilidad

Véase el apartado C.2.1.2.

- ii) Identidad

La identidad del VFS y del VMIX se determina en células RK-13 por uno de los métodos de identificación del agente (por ejemplo, FAT o IPMA empleando suero mono específico o MAb).

- iii) Seguridad

Se toman muestras de un lote producido de acuerdo con el proceso de fabricación. La dosis a utilizar deberá contener el título o potencia máximos establecidos por el fabricante (título de liberación).

- a) Vacuna heteróloga contra el virus del fibroma de Shope

La patogenicidad de las cepas del virus del fibroma de Shope se prueba inoculando conejos con diluciones seriadas de los sobrenadantes obtenidos al centrifugar las preparaciones de los tumores. Las características macroscópicas e histopatológicas y el desarrollo de los fibromas se prueba periódicamente en conejos SPF. (Numerosos pases seriados en conejos pueden inducir una mutación a la cepa IA inflamatoria, que produce lesiones graves que son más inflamatorias que neoplásicas).

- b) Vacuna homóloga viva atenuada contra la mixomatosis y vacuna viva atenuada recombinante contra el VMIX+VEHC

La patogenicidad residual de las cepas del MV se prueba por inyección intradérmica en conejos SPF o en conejos sin vacunar libres de mixomatosis. Estos conejos no deberían presentar más que una reacción local, posiblemente con pequeñas lesiones secundarias en la cabeza, que desaparecen a los pocos días.

En ambos casos, se debe registrar la temperatura rectal y el peso corporal como parámetros adicionales.

2.3. Requisitos de autorización/registro/licencia

2.3.1. Proceso de fabricación

Para registrar una vacuna, deben presentarse a las autoridades todos los datos pertinentes relativos a la fabricación (véase el apartado C.2.2) y a las pruebas de control de calidad (véase el apartado C.2.1.2). Esta información debe corresponder a tres lotes de vacuna consecutivos de un volumen no inferior a 1/3 del volumen habitual de un lote industrial. Los controles durante el proceso forman parte del proceso de fabricación.

2.3.2. Requisitos de seguridad

Para comprobar distintos aspectos de la seguridad deben realizarse varias pruebas. Debe llevarse a cabo una prueba de la seguridad de una dosis diez veces superior a la norma. Además, es necesario examinar si el virus vacunal se disemina a los órganos en el animal vacunado, la capacidad del virus vacunal de transmitirse entre el animal vacunado y animales que entren en contacto con el mismo, y una prueba de reversión a la virulencia.

i) Prueba de seguridad de una dosis diez veces superior a la normal

Tras la rehidratación, se inyectan por vía subcutánea diez dosis de la vacuna liofilizada contra el VFS a tres conejos susceptibles, que a continuación se observarán durante 21 días. Las reacciones locales deben ser leves, y no deben generalizarse ni afectar a la salud general. La vacuna contra el VMIX se analiza inyectando diez dosis por vía intradérmica en las orejas de tres conejos susceptibles, que a continuación se observarán durante 21 días. El mixoma primario debe permanecer leve y no deben producirse reacciones anómalas, ni locales ni sistémicas.

ii) Prueba de seguridad de la vacuna en conejas gestantes

Se administra el virus a un mínimo de diez conejas gestantes de acuerdo con la pauta recomendada en la ficha técnica. Estos animales se observarán hasta el día 1 post-parto. Las conejas deben conservar un buen estado de salud y no debe haber reacción anómala, ni local ni sistémica. No deben observarse efectos adversos en la gestación ni en la descendencia.

iii) Prueba de reversión a la virulencia

Se administra por una vía recomendada a dos conejos de 5–7 semanas de edad y que no tengan anticuerpos contra el virus *Myxoma*, una cantidad de virus que permita recuperar virus para los pases que se describen más adelante. Se utiliza virus vacunal que se encuentre al mínimo nivel de pases atenuados que habrá entre el lote de inóculo primario y un lote de la vacuna. Se sacrifica a los conejos 5–10 días después de la inoculación y se extraen los órganos o tejidos de los animales con suficiente virus como para permitir un pase; se homogeneizan los órganos y los tejidos en una solución tampón adecuada, que a continuación se centrifuga, y el sobrenadante se utiliza para pases posteriores. Se inocula el sobrenadante en cultivos celulares adecuados para verificar la presencia del virus. Se administra, por una vía recomendada y con la rapidez apropiada, un volumen adecuado del sobrenadante a dos conejos más de la misma edad y con la misma susceptibilidad. Este paso se repite al menos cinco veces. Si el virus ha desaparecido, se lleva a cabo una segunda serie de pases. Se inocula virus recuperado del máximo nivel de pases a conejos, se observan durante 28 días y se comparan las posibles reacciones con las que se hallen en la prueba de seguridad que se describe arriba. No debe haber indicios de aumento de virulencia en comparación con el virus sin pases. Si no se recupera virus en ninguna de las dos series de pases, el virus vacunal también supera la prueba.

2.3.3. Requisitos de eficacia

Se deben realizar diferentes pruebas con lotes representativos del producto final que contengan el mínimo título o potencia. Tanto para las vacunas contra el VFS como para las vacunas contra el VMIX se adopta el mismo protocolo. El efecto protector se determina como sigue:

Se inoculan como mínimo diez conejos adultos con una dosis de vacuna, y cinco conejos no vacunados sirven de control. Después de un mínimo de 21 días tras la vacunación, a todos los conejos se les inocula por una vía adecuada (por ejemplo, intradérmica en los párpados, o en dos puntos de los flancos) una cepa patógena del VMIX (ejemplo: 0,1 ml de inóculo de la cepa vírica Lausanne que contenga 10^3 DI₅₀ [mediana de la dosis infectiva]). Se observa a los conejos durante 21 días más. La prueba no será válida si presenta signos clínicos de mixomatosis menos de un 90% de los conejos control. Una vacuna que contenga el VMIX supera la prueba si como mínimo un 90% de los conejos vacunados no presenta signos de mixomatosis.

Una vacuna que contenga el VFS supera la prueba si como mínimo un 75% de los conejos vacunados no presenta signos de mixomatosis.

El fabricante debe haber establecido un título o potencia mínima teniendo en cuenta la pérdida de potencia que tiene lugar durante el periodo de validez.

2.3.4. Duración de la inmunidad

Se vacunan varios grupos de diez conejos susceptibles. Un grupo se analiza mediante una infección de desafío (como en la prueba de eficiencia, véase el apartado C.2.3.3) al cabo de 1, 2, 3, etc. meses tras la vacunación contra el VFS, y 1, 3, 6 y 9 meses después de la vacunación contra el VMIX. La duración de la inmunidad es el tiempo durante el cual como mínimo un 90% de conejos vacunados con una vacuna que contiene el VMIX o como mínimo el 75% de conejos vacunados contra el VFS no presenta signos de mixomatosis.

2.3.5. Estabilidad

Son necesarias pruebas de estabilidad (basadas en una prueba de potencia aceptable) para comprobar la validez de la fecha de caducidad que aparece en el envase del producto. Algunas autoridades permiten utilizar pruebas de estabilidad en condiciones aceleradas para determinar una fecha de caducidad provisional para ciertos productos, por ejemplo, una incubación a 37°C durante 1 semana por cada año de validez. Estas estimaciones deben confirmarse con pruebas periódicas de potencia en tiempo real con al menos tres lotes/series distintos a lo largo del periodo de validez, y 3–6 meses después del mismo. En el caso de las vacunas vivas atenuadas, deben realizarse pruebas en el momento de la liberación y aproximadamente el día que caduquen, hasta que se haya establecido un registro estadísticamente válido.

Se realizan titulaciones del virus vacunal en al menos tres lotes de vacuna a intervalos de hasta 3 meses a partir de la fecha de caducidad indicada.

BIBLIOGRAFÍA

ALBINI S., SIGRIST B., GÜTTINGER R., SCHELLING C., HOOP R.K. & VÖGTLIN A. (2012). Development and validation of a *Myxoma* virus real-time polymerase chain reaction assay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **24**, 135–137.

ANGULO E. & BARCENA J. (2007). Towards a unique and transmissible vaccine against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease for rabbit populations. *Wildl. Res.*, **34**, 567–577.

ARGUELLO VILLARES J.L. (1986). Contribución a la profilaxis de la mixomatosis del conejo mediante el uso de una ceba homóloga. *Medicina Veterinaria*, **3**, 91–103.

BELSHAM G.J., POLACEK C., BREUM S.Ø., LARSEN L.E. & BØTNER A. (2010). Detection of myxoma viruses encoding a defective M135R gene from clinical cases of myxomatosis; possible implications for the role of the M135R protein as a virulence factor. *Virology*, **7**, 7.

BERTAGNOLI S., GELFI J., LEGALL G., BOILLETOT E., VAUTHEROT J.F., RASSCHAERT D., LAURENT S., PETIT F., BOUCRAUT-BARALON C. & MILON A. (1996). Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant *Myxoma* virus expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. *J. Virol.*, **70**, 5061–5066.

- BEST S.M., COLLINS S.V. & KERR P.J. (2000). Coevolution of host and virus: cellular localization of virus in *Myxoma* virus infection of resistant and susceptible European rabbits. *Virology*, **277**, 76–91.
- CAMUS-BOUCLAINVILLE C., GRETILLAT M., PY R., GELFI J., GUERIN J.L. & BERTAGNOLI S. (2011). Genome sequence of SG33 strain and recombination between wild-type and vaccine myxoma viruses. *Emerg. Infect. Dis.*, **17**, 633–638.
- CANCELLOTTI F.M., GELMETTI D. & TURILLI C. (1986). Diagnostic techniques for early diagnosis of rabbit Myxomatosis. *IV International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians*. Amsterdam, Netherlands. Utrecht: Koninklijke Nederlandse Maatschappij voor Diergeneeskunde, pp 798–801.
- CAVADINI P., BOTTI G., BARBIERI I., LAVAZZA A. & CAPUCCI L. (2010). Molecular characterization of SG33 and Borghi vaccines used against myxomatosis. *Vaccine*, **28**, 5414–5420.
- DUARTE M.D., BARROS S.C., HENRIQUES A.M., FAGULHA M.T., RAMOS F., LUÍS T. & FEVEIREIRO M. (2013). Development and validation of a real-time PCR for the detection of *Myxoma* virus based on the diploid gene M000.5L/R. *J. Virol. Methods*, **196C**, 219–224.
- FENNER F. (1994). *Myxoma* virus. In: *Virus Infections of Vertebrates*, Vol. 5. *Virus Infections of Rodents and Lagomorphs*, Osterhaus A.D.M.E., ed. Elsevier Science B.V., Amsterdam, Netherlands, pp. 59–71.
- FENNER F. & FANTINI B. (1999). *Biological Control of Vertebrate Pests. The History of Myxomatosis – an Experiment in Evolution*. CAB International, New York, USA.
- FENNER F. & RATCLIFFE F.N. (1965). *Myxomatosis*. Cambridge University Press, London, UK.
- FENNER F. & WOODROOFE G.M. (1954). Protection of laboratory rabbits against myxomatosis by vaccination with fibroma virus. *Aust. J. Exp. Biol.*, **32**, 653–668.
- GELFI J., CHANTAL J., PHONG T.T., PY R. & BOUCRAUT-BARALON C. (1999). Development of an ELISA for detection of *Myxoma* virus-specific rabbit antibodies; test evaluation for diagnostic applications on vaccinated and wild rabbit sera. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 240–245.
- GILBERT Y., PICAUVET D.P. & CHANTAL J. (1989). Diagnostic de la myxomatose: mise au point d'une technique d'immunofluorescence indirecte. Utilisation de prélèvements sanguins sur papier buvard pour la recherche d'anticorps. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **8**, 209–220.
- GORSKI J. & MIZAK B. (1985). Polish vaccine against myxomatosis in rabbits. *Med. Weter.*, **41**, 113–116.
- JERABEK J. (1980). Applicability of Shope fibroma virus replicated in cell cultures for immunoprophylaxis of rabbit myxomatosis. *Acta Vet. Brno*, **49**, 259–267.
- JOUBERT L. (1973). *La Myxomatose T.II. Série : Les Maladies Animales à Virus*. L'Expansion éditeur, Paris, France.
- KERR P.J. (1997). An ELISA for epidemiological studies of myxomatosis: persistence of antibodies to *Myxoma* virus in European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Wildl. Res.*, **24**, 53–65.
- MARCATO P.S. & ROSMINI R. (1986). *Patologia del coniglio e della lepre, atlante a colori e compendio*. Società Editrice Esculapio, Bologna, Italy, pp. 16–22.
- MARLIER D., MAINIL J., LINDEN A. & VINDEVOGEL H. (2000). Infectious agents associated with rabbit pneumonia: isolation of amyxomatous myxoma virus strains. *Vet. J.*, **159**, 171–178.
- MCKERCHER D.G. & SAITO J.K. (1964). An attenuated live virus vaccine for myxomatosis. *Nature*, **202**, 933–934.
- SAURAT P., GILBERT Y. & GANIERE J.P. (1978). Etude d'une souche de virus myxomateux modifié. *Rev. Med. Vet.*, **129**, 415–451.
- SHOPE R.E. (1932). A filtrable virus causing a tumor like condition in rabbits and its relationship to virus myxomatosis. *J. Exp. Med.*, **56**, 803.
- SMALLWOOD S.E., RAHMAN M.M., SMITH D.W. & MCFADDEN G. (2010). *Myxoma* virus: propagation, purification, quantification, and storage. *Curr. Protoc. Microbiol.*, May; Chapter 14: Unit 14A.1. doi: 10.1002/9780471729259.mc14a01s17.

SPIBEY N., MCCABE V.J., GREENWOOD N.M., JACK S.C., SUTTON D. & VAN DER WAART L. (2012). Novel bivalent vectored vaccine for control of myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease. *Vet. Rec.*, **170**, 309–313.

SOBEY W.R., CONOLLY D. & ADAMS K.M. (1966). Myxomatosis: a simple method of sampling blood and testing for circulating soluble antigens or antibodies to them. *Aust. J. Sci.*, **28**, 354.

STUART N.I. (2004). *Methods in Molecular Biology: Vaccinia Virus and Poxvirology*. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, pp. 122–125.

TOZZINI F. & MANI P. (1975). Studio su alcune caratteristiche di crescita del virus della mixomatosi ceppo Pisa 73. *Arch. Vet. Ital.*, **26**, 19–26.

VON DER AHE C., DEDEK J. & LOEPELMANN H. (1981). Ergebnisse und Erfahrungen in der DDR bei der staatlichen Prüfung und Praxiserprobung der aus der CSSR importierten Myxomatose-Vakzine. *Monatshe. Veterinarmed.*, **36**, 492–495.

*

* *

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

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2014.