CAPÍTULO 3.8.12.

# VIRUELA OVINA Y VIRUELA CAPRINA

## RESUMEN

*La viruela ovina y la viruela caprina son enfermedades víricas de las ovejas y de las cabras que se caracterizan por fiebre, aparición de pápulas o nódulos generalizados, vesículas (en ocasiones muy infrecuentes), lesiones internas (en concreto en los pulmones), y la muerte. Ambas enfermedades están causadas por cepas de un capripoxvirus, todas las cuales pueden afectar a las ovejas y a las cabras. Aunque la mayoría de las cepas examinadas causan la enfermedad clínica en su forma más grave, o bien en las ovejas o bien en las cabras, se han aislado algunas cepas que son igual de patógenas en ambas especies.*

*El virus de la viruela ovina (VVO) y el virus de la viruela caprina (VVC) son agentes causales de la viruela ovina y caprina, y junto con el virus de la dermatitis nodular contagiosa, configuran el género* Capripoxvirus*, que pertenece a la familia* Poxviridae*. Los virus de la viruela ovina y de la viruela caprina son endémicos en la parte de África situada al norte del ecuador, en Oriente Medio y en Asia, aunque ciertas partes de Europa han experimentado brotes recientemente. Los países que notificaron brotes de la enfermedad entre 2010 y 2015 fueron Bulgaria, Taipei Chino, Israel, Kazajstán, Kirguistán, Mongolia, Marruecos y Rusia, mientras que Grecia, Israel y Rusia han experimentado incidencias recurrentes.*

***Identificación del agente:*** *La confirmación de la viruela ovina y de la viruela caprina en el laboratorio es más rápida si se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) junto con un historial clínico compatible con una infección generalizada por viruela caprina.*

*El aislamiento del virus es posible porque los parapoxvirus crecen en los cultivos de tejidos de origen ovino, caprino o bovino, aunque las cepas naturales pueden necesitar hasta 14 días para crecer, o requerir uno o más pases adicionales en cultivos de tejidos. El virus produce inclusiones intracitoplasmáticos que se observan con claridad mediante la tinción con hematoxilina y eosina. El antígeno se puede detectar también en cultivos de tejidos utilizando sueros específicos y las técnicas de inmunoperoxidasa o de inmunofluorescencia. Puede observarse antígeno de capripoxvirus y cuerpos de inclusión en cortes obtenidos en un microtomocriostato o incluidos en parafina teñidos a partir de lesiones biopsiadas o de material muestreado post-mortem.*

*Se ha elaborado un enzimoinmunoanálisis (ELISA) utilizando un suero de detección policlonal generado frente a un antígeno inmunodominante recombinante de capripoxvirus.*

***Pruebas serológicas:*** *La prueba de neutralización vírica es la prueba serológica más específica. La inmunofluorescencia indirecta es menos específica debido a las reacciones cruzadas con anticuerpos frente a otros poxvirus. El análisis de inmunoelectrotransferencia en el que se utiliza la reacción entre el antígeno P32 del capripoxvirus y sueros problema es sensible y específico, pero resulta caro y difícil de llevar a cabo. El uso de este antígeno o de otros antígenos adecuados expresados por un vector apropiado ofrece la posibilidad de realizar con un ELISA una prueba serológica aceptable y estandarizada en el futuro.*

***Requisitos para las vacunas:*** *Para el control de la viruela ovina y de la viruela caprina se han empleado vacunas vivas e inactivadas. Todas las cepas de capripoxvirus examinadas hasta ahora comparten un sitio de neutralización principal y algunas presentan una protección cruzada. Las vacunas inactivadas en el mejor de los casos proporcionan inmunidad solo a corto plazo.*

# A. INTRODUCCIÓN

El género *Capripoxvirus*, que pertenece a la familia *Poxviridae,* está formado por tres especies: el virus de la dermatitis nodular contagiosa, que causa enfermedad solo en el ganado bovino (véase el Capítulo 3.4.12), y los virus de la viruela ovina (VVO) y de la viruela caprina (VVC), que causan enfermedad en las ovejas y en las cabras, respectivamente. La viruela ovina y la viruela caprina se caracterizan por causar nódulos cutáneos diseminados y hasta un 100% de mortalidad en razas ovinas y caprinas completamente susceptibles.

En los animales autóctonos, la enfermedad y la mortalidad generalizadas son menos frecuentes, aunque sí se observan en los lugares donde la enfermedad ha estado ausente en una zona o en un pueblo durante un período de tiempo al introducir métodos intensivos de cría, o en asociación con agentes causales de otras enfermedades, tales como el virus de la peste de los pequeños rumiantes o el virus de la fiebre aftosa. Los virus de la viruela ovina y de la viruela caprina suponen restricciones importantes a la introducción de especies ovinas y caprinas exóticas a zonas endémicas, así como al desarrollo de una producción pecuaria intensiva.

Tanto el VVO como el VVC se pueden transmitir entre ovejas y cabras, aunque la mayoría solamente causa la enfermedad clínica más grave en una especie; el VVO y el VVC dan lugar a enfermedades transfronterizas que se propagan periódicamente a zonas adyacentes no endémicas. La viruela ovina y la viruela caprina son endémicas en la parte de África situada al norte del ecuador y en ciertas partes de Oriente Medio y de Asia (se puede consultar la distribución actual en el WAHIS de la OIE (http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/portal-wahis-datos-de-salud-animal/). Se han reportado brotes en países no endémicos de Asia, Europa y Oriente Medio.

El período de incubación de los virus de la viruela ovina y de la viruela caprina dura entre 8 y 13 días después del contacto entre un animal infectado y los animales susceptibles. Dicho período puede reducirse a 4 días después de una infección experimental por inoculación intradérmica o por transmisión mecánica por insectos. Algunas razas de oveja europea, tal como la Soay, pueden morir de una infección aguda antes de que aparezcan las lesiones cutáneas. En otras razas se produce una elevación inicial de la temperatura rectal por encima de los 40°C, seguida inicialmente, en 2–5 días, por la aparición de máculas – pequeñas zonas de hiperemia delimitadas que son más evidentes en la piel no pigmentada – y, posteriormente, por la aparición de pápulas – hinchazones duras de entre 0,5 y 1 cm de diámetro – que pueden cubrir todo el cuerpo o restringirse a las ingles, las axilas y el periné. Las pápulas pueden estar cubiertas por vesículas llenas de líquido, pero esto es muy infrecuente. Algunos investigadores han distinguido entre una forma vesicular y una nodular de la viruela ovina y la viruela caprina (Zro *et al*., 2014b).

Dentro de las 24 horas posteriores a la aparición generalizada de pápulas, los animales afectados presentan rinitis, conjuntivitis y un aumento del tamaño de todos los ganglios linfáticos superficiales, y en concreto de los ganglios preescapulares. Las pápulas de los párpados producen blefaritis de gravedad variable. Conforme se ulceran las pápulas de las mucosas ocular y nasal, las secreciones se vuelven mucopurulentas, y las mucosas oral, anal y prepucial o vaginal se necrosan. La respiración se hace pesada y ruidosa por la presión sobre las vías respiratorias altas causada por los ganglios linfáticos retrofaríngeos, que están hinchados como consecuencia de las lesiones pulmonares en desarrollo.

Si el animal afectado no muere en esta fase aguda de la enfermedad, las pápulas comienzan a necrosarse a partir de la necrosis isquémica derivada de la formación de trombos en los vasos sanguíneos situados en la base de la pápula. En los siguientes 5–10 días, las pápulas forman costras que persisten hasta 6 semanas dejando pequeñas cicatrices. Las lesiones cutáneas son susceptibles al ataque de las moscas, y es frecuente una neumonía secundaria. No es habitual la anorexia a no ser que las lesiones de la boca interfieran físicamente con la alimentación. El aborto es poco frecuente.

En el examen post-mortem, las lesiones cutáneas son a menudo menos manifiestas en el animal con infección aguda que en el animal vivo. Las mucosas aparecen necrosadas y todos los ganglios linfáticos del cuerpo han aumentado de tamaño y están edematosos. Las pápulas, que pueden ulcerarse, se pueden encontrar habitualmente en la mucosa abomasal, y algunas veces en la pared del rumen y del intestino grueso, en la lengua, en el paladar duro y en el blando, en la tráquea y en el esófago. Ocasionalmente, pueden observarse zonas pálidas de aproximadamente 2 cm de diámetro en la superficie del riñón y del hígado, y se ha descrito su presencia en los testículos. Con frecuencia se observan numerosas lesiones graves de hasta 5 cm de diámetro por todas las partes de los pulmones, pero sobre todo en los lóbulos diafragmáticos.

Los signos clínicos y las lesiones observadas en el examen post-mortem varían considerablemente en función de la raza del hospedador y de la cepa de capripoxvirus. Las razas autóctonas son menos sensibles y, con frecuencia, muestran solo unas pocas lesiones que pueden confundirse con picaduras de insectos o con la dermatitis pustular contagiosa. Sin embargo, se observan con frecuencia casos de animales afectados por viruela ovina o caprina de forma generalizada y a veces mortal en: corderos que han perdido su inmunidad materna; animales a los que se ha mantenido aislados; y animales llevados a zonas endémicas, procedentes de

pueblos aislados, en concreto si se les ha sometido al estrés del desplazamiento a largas distancias y se les ha mezclado con otras ovejas y cabras y sus agentes patógenos. Después de la infección con capripoxvirus se produce invariablemente una alta mortalidad en razas ovinas y caprinas importadas sin ninguna protección previa. Ni la viruela ovina ni la caprina son infecciosas para los humanos.

# B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

***Tabla 1.*** *Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la viruela ovina y la viruela caprina 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 agente[1]** | | | | | | |
| **Aislamiento del virus** | + | ++ | + | +++ | + | – |
| **Detección de antígeno** | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | – |
| **PCR** | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | – |
| **Detección de respuesta inmunitaria** | | | | | | |
| **VN** | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| **IFA** | + | + | + | + | + | + |

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones;
+ = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.
PCR = reacción en cadena de la polimerasa; VN = prueba de neutralización vírica; IFA = inmunofluorescencia indirecta.

## 1. Identificación del agente

### 1.1. Obtención y preparación de las muestras

Debe obtenerse material para el aislamiento del virus y la detección del antígeno mediante biopsia o en el examen post-mortem a partir de las pápulas cutáneas, de las lesiones de los pulmones o de los ganglios linfáticos. Pueden obtenerse muestras para la detección del genoma mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) antes o después de que aparezca la respuesta de anticuerpos neutralizantes. Para el aislamiento del virus también puede utilizarse la capa leucocitaria de sangre obtenida con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) durante la fase virémica de la infección por la viruela caprina (antes de que se generalicen las lesiones o en un plazo de 4 días tras la generalización). Las muestras para el examen histológico han de incluir tejido procedente de las zonas circundantes, e inmediatamente después de su obtención se han de colocar en formalina al 10% o en solución formal neutral tamponada al 10%, en un volumen que sea diez veces el de la muestra

Los tejidos en formalina no tienen requisitos especiales para el transporte. Deben obtenerse muestras de sangre para el aislamiento del virus a partir de la capa leucocitaria, y deben introducirse en tubos con anticoagulante, colocarse inmediatamente en hielo y procesarse lo antes posible. En la práctica, las muestras de sangre deben conservarse a 4°C durante un máximo de dos días antes de su procesamiento, pero no deben congelarse ni mantenerse a temperatura ambiente. Los tejidos y las costras secas destinados al aislamiento de virus, la detección de antígenos o la detección de genoma se conservarán preferiblemente a 4°C, o bien en hielo o a –20°C. Si hay que transportar las muestras

1 Se recomienda aplicar una combinación de métodos de identificación a una única muestra clínica.

a largas distancias sin refrigeración, el medio de transporte deberá contener glicerol al 10%; las muestras deberán tener el tamaño suficiente para que el medio de transporte no llegue a la parte central de la biopsia, que se utilizará para el aislamiento o la detección del virus.

### 1.2. Aislamiento del virus

El material de las lesiones para el aislamiento de virus y para la detección del antígeno se homogeneiza. Una técnica para la homogeneización es la siguiente: se pica el tejido en trozos pequeños mediante tijeras y pinzas, y después se macera en un molino con bolas de acero o se muele con una mano de mortero estéril con arena estéril y un volumen igual de solución salina tamponada con fosfato (PBS) o Medio de Eagle Modificado (MEM) sin suero que contenga penicilina sódica (1.000 unidades internacionales [UI]/ml), sulfato de estreptomicina (1 mg/ml), micostatina (100 UI/ml) o fungizona (2,5 µg/ml) y neomicina (200 UI/ml). La suspensión homogeneizada se congela y descongela tres veces y posteriormente se clarifica por centrifugación, empleando una centrífuga de sobremesa, a 600 ***g*** durante 10 minutos. En los casos en que sea esperable que la muestra esté contaminada con bacterias (como cuando el virus se aísla de muestras cutáneas), el sobrenadante se puede filtrar por un tamaño de poro de 0,45 µm tras la centrifugación, sin embargo, la cantidad de virus del sobrenadante podría reducirse. Pueden prepararse una capa leucocitaria a partir de 5–8 ml de sangre sin coagular por centrifugación a 600 ***g*** durante 15 minutos; la capa se transfiere cuidadosamente a 5 ml de agua bidestilada fría empleando una pipeta Pasteur estéril. Pasados 30 segundos, se añaden 5 ml de medio de crecimiento frío y a doble concentración, y se mezclan. La mezcla se centrífuga a 600 ***g*** durante 15 minutos, se desecha el sobrenadante y el sedimento de células se suspende en 5 ml de medio de crecimiento como el medio Eagle modificado por Glasgow (GMEM). Después de la centrifugación a 600 ***g*** durante otros 15 minutos, el sedimento resultante se suspende en 5 ml de GMEM recién preparado. Como alternativa, la capa leucocitaria se puede obtener retirándola de una muestra heparinizada mediante un gradiente de densidad.

El capripoxvirus crecerá en cultivos de tejidos de origen bovino, ovino o caprino, aunque se considera que los cultivos primarios y secundarios de células de testículo (LT) o de riñón (LK) de cordero son las más susceptibles, en particular las que derivan de una raza ovina lanar. A continuación se ofrece un ejemplo de una técnica de aislamiento; se inocula un frasco de cultivo celular de 25 $cm^2$ LT o LK (con un 90% de confluencia) con 1 ml ya sea de la suspensión de la capa leucocitaria o del sobrenadante de la preparación clarificada de la biopsia, y se deja que el sobrenadante se adsorba a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, se lava el cultivo con PBS caliente y se cubre con 10 ml de un medio adecuado, como GMEM, que contenga antibióticos y suero fetal bovino al 2%. Si se dispone de ellos, se infectan también tubos de cultivos de tejidos que contengan células LT o LK y un cubreobjetos, o portaobjetos para cultivos de tejidos.

Los frascos se examinarán diariamente durante 7–14 días para comprobar si presentan indicios de efecto citopático (ECP). Los frascos contaminados deben desecharse. Las células infectadas desarrollan un ECP característico que consiste en la retracción de la membrana celular de las células circundantes, y finalmente en el redondeamiento de las células, quedando la cromatina nuclear situada en el margen. Al principio solo pueden observarse pequeñas zonas de ECP, algunas veces tan solo 4 días después de la infección; a los largo de los siguientes 4–6 días se expanden hasta cubrir todo el tapiz celular. Si antes de 7 días no hay signos de ECP, se congelará y descongelará el cultivo tres veces, y se inoculará sobrenadante clarificado en un cultivo fresco de células LT o LK. Al primer signo de ECP en los frascos, o antes en el caso de que se estén usando varios cubreobjetos infectados, se tomará un cubreobjetos, se fijará con acetona y se teñirá empleando H-E. La presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinófilos que son de tamaño variable, pero que pueden medir hasta la mitad del tamaño del núcleo y están rodeados por un halo transparente, es indicativa de la infección por el virus de la viruela ovina y la viruela caprina. La formación de sincitios no es una característica de la infección por capripoxvirus. Si el efecto citopático se debe a la infección por capripoxvirus del cultivo celular, se puede evitar o retrasar mediante la inclusión de un suero anticapripoxvirus en el medio; esto proporciona una identificación preliminar del agente. Algunas cepas de capripoxvirus se han adaptado para crecer en las células de riñón de mono verde africano (células Vero), pero estas no se recomiendan para el aislamiento primario.

### 1.3. Microscopía electrónica

Se puede visualizar el virión de poxvirus característico empleando una técnica de preparación con tinción negativa seguida de examen al microscopio electrónico. Existen varios protocolos de tinción negativa distintos, como el del siguiente ejemplo:

Antes de la centrifugación, se prepara material de la suspensión original de tejido para su examen en un microscopio electrónico de transmisión de la siguiente manera: sobre una gota de la suspensión colocada sobre parafina o sobre una placa de cera, se deja flotar una rejilla de microscopía electrónica

de malla hexagonal 400 con un substrato de Piloform-carbón activado por una descarga luminiscente en vapor de pentilamina. Transcurrido 1 minuto, la rejilla se transfiere a una gota de tampón Tris/EDTA, pH 7,8, durante 20 segundos y después a una gota de ácido fosfotúngstico al 1%, pH 7,2, durante 10 segundos. Se escurre la rejilla empleando papel de filtro, se deja secar al aire y se coloca en el microscopio electrónico. El virión de la viruela ovina y caprina tiene forma de ladrillo, está cubierto por elementos tubulares cortos y mide aproximadamente 290 × 270 nm. Algunos de los viriones pueden estar envueltos por una membrana que procede de la célula del hospedador, de los cuales debe examinarse el mayor número posible para confirmar su aspecto (Kitching y Smale, 1986).

Los viriones de los capripoxvirus no se distinguen de los de ortopoxvirus, pero, aparte del virus vacunal, ningún ortopoxvirus causa lesiones en las ovejas ni en las cabras. Sin embargo, el capripoxvirus se distingue de los viriones de los parapoxvirus, que causan dermatitis pustular contagiosa, puesto que aquellos son más pequeños, de forma ovalada, y cada uno de ellos está cubierto por un único elemento tubular continuo que se manifiesta en forma de estriaciones sobre el virión.

### 1.4. Histopatología

El material para la histopatología debe prepararse según las técnicas estándar. Después de la preparación, de la tinción con H-E y del montaje del material de biopsia fijado con formalina, se examinarán varias secciones al microscopio óptico. En el examen histológico, los aspectos más característicos de las lesiones cutáneas en fase aguda son un infiltrado celular masivo, vasculitis y edema. Las lesiones tempranas se caracterizan por una inflamación perivascular marcada. Inicialmente, la infiltración es por macrófagos, neutrófilos y ocasionalmente eosinófilos, y a medida que progresa la lesión se infiltran más macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. Un rasgo característico de todas las infecciones por capripoxvirus es la presencia en la dermis de cantidades variables de “células de la viruela ovina”. Estas células de la viruela ovina pueden aparecer también en otros órganos en los que hay lesiones microscópicas de viruela ovina y caprina. Estas células son grandes, estrelladas, eosinófilas, con inclusiones intracitoplasmáticas mal definidas y núcleos vacuolados. La vasculitis va acompañada de trombosis e infarto, produciendo edema y necrosis. Los cambios epidérmicos consisten en acantosis, paraqueratosis e hiperqueratosis. Los cambios en los órganos son similares, con infiltración celular predominante y vasculitis. Las lesiones en el tracto respiratorio superior se caracterizan por la ulceración.

### 1.5 Métodos inmunológicos

#### 1.5.1. Pruebas con anticuerpos fluorescentes

El antígeno de capripoxvirus también puede identificarse en cubreobjetos infectados o portaobjetos para cultivo tisular, utilizando pruebas con anticuerpos fluorescentes. Los cubreobjetos o los portaobjetos se lavarán, se dejarán secar al aire y se fijarán con acetona fría durante 10 minutos. La prueba indirecta utilizando sueros ovinos o caprinos está expuesta a la aparición de un color de fondo muy oscuro y a reacciones no específicas. Sin embargo, se puede preparar un conjugado directo a partir de sueros de ovejas o cabras convalecientes o de conejos hiperinmunizados con capripoxvirus purificado. Como control negativo deben incluirse los cultivos de tejidos sin infectar, porque las reacciones cruzadas pueden causar problemas debido a los anticuerpos contra los antígenos de los cultivos de tejidos. Se ha utilizado también la técnica con anticuerpos fluorescentes sobre portaobjetos en cortes de tejido preparados en un microtomocriostato.

### 1.6. Métodos de reconocimiento del ácido nucleico

Los métodos de amplificación para la detección de ADN del genoma vírico son específicos del género *Capripoxvirus* y sensibles para la detección a lo largo de todo el curso de la enfermedad, incluso antes y después de la aparición de las respuestas de anticuerpos. Estos métodos son la PCR convencional, la PCR en tiempo real y, más recientemente, la amplificación isotérmica mediada por bucle. Pueden emplearse métodos de reconocimiento del ácido nucleico para detectar el genoma del capripoxvirus en muestras de biopsia, hisopo o cultivo celular.

#### 1.6.1. Métodos de PCR convencional

Se han descrito varios métodos de PCR convencional con distintas especificidades para los virus capripox en general, el virus de la viruela ovina y el virus de la viruela caprina (Heine *et al.,* 1999; Ireland & Binepal, 1998; Zro *et al.,* 2014a). Los métodos de PCR convencional son especialmente útiles para la obtención de material genético suficiente para la identificación a nivel de especie y para la posterior secuenciación y análisis filogenético (Le Goff *et al.,* 2009).

#### 1.6.2. Métodos de PCR en tiempo real

Se han desarrollado y validado varios métodos de PCR en tiempo real basados en la detección con fluorescencia que son muy sensibles y específicos (Balinsky *et al*., 2008; Bowden *et al.,* 2008; Das *et al.,* 2012; Stubs *et al.,* 2012). Cada prueba detecta un pequeño locus genético conservado dentro del genoma del capripoxvirus, pero estos métodos no permiten diferenciar entre el virus de la viruela ovina, el virus de la viruela caprina y el virus de la dermatitis nodular contagiosa. Se han descrito métodos de PCR en tiempo real para el genotipado directo de virus capripox sin necesidad de secuenciación génica (Gelaye *et al.,* 2013; Lamien *et al.,* 2011).

#### 1.6.3. Amplificación isotérmica del genoma

Se ha observado que ciertas pruebas moleculares en las que se utiliza la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para detectar genomas de capripoxvirus ofrecen una sensibilidad y una especificidad similares a las de la PCR en tiempo real con un método más sencillo y barato (Das *et al.,* 2012; Murray *et al.,* 2013). Omoga *et al.,* 2016 ha descrito en mayor detalle la validación a nivel de campo del método de la LAMP de Das *et al.,* 2012, y se ha comprobado que la combinación de esta prueba de detección de capripoxvirus con dos pruebas más de LAMP resulta útil para diferenciar entre los virus de la viruela caprina y de la viruela ovina (Zhao *et al.,* 2014).

## 2. Pruebas serológicas

### 2.1. Neutralización vírica

Un suero problema se puede titular bien frente a un título constante de capripoxvirus (100 $DICT_{50}$ [dosis infectiva 50% en cultivo tisular]) o bien una cepa de un virus de referencia se puede titular frente a una dilución constante de suero problema para calcular un índice de neutralización. El método preferido es el índice de neutralización debido a la sensibilidad variable de los cultivos de tejidos a capripoxvirus, y la consecuente dificultad para garantizar el uso de 100 $DICT_{50}$, aunque no requiere un volumen mayor de sueros problema. Según la descripción de la prueba, se utilizan placas de microtitulación de cultivos de tejidos de 96 pocillos de fondo plano, pero se puede realizar perfectamente igual en tubos de cultivos de tejidos aplicando los cambios apropiados a los volúmenes utilizados, aunque la lectura de un punto final en los tubos es más difícil. Se ha descrito que el uso de células Vero en la prueba de neutralización de virus produce resultados más constantes (Kitching & Taylor, 1985).

#### 2.1.1. Procedimiento analítico

i) Los sueros problema, incluyendo un control positivo y un control negativo, se diluyen a 1/5 en medio Eagle/HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina, ácido N-2-etanosulfónico) y se inactivan a 56°C durante 30 minutos.

ii) A continuación, se deposita un volumen de 50 µl del primer suero inactivado en los pocillos de las columnas 1 y 2, de las filas A a la H de la placa de microtitulación. El segundo suero se coloca en los pocillos de las columnas 3 y 4, el tercero en las columnas 5 y 6, el suero de control positivo en las columnas 7 y 8, el control de suero negativo en las columnas 9 y 10, y se depositan 50 µl de medio Eagle/HEPES sin suero en las columnas 11 y 12 y en todos los pocillos de la fila H.

iii) Una cepa de referencia de capripoxvirus, que normalmente es una cepa vacunal que se sabe que crece bien en cultivos de tejidos, con un título superior a $log_{10}$ 6 $DICT_{50}$ por ml se diluye en medio Eagle/HEPES en frascos con tapón de rosca para obtener diluciones logarítmicas seriadas de $log_{10}$ 5,0; 4,0; 3,5; 3,0; 2,5; 2,0; 1,5 $DICT_{50}$ por ml (equivalentes a $log_{10}$ 3,7; 2,7; 2,2; 1,7; 1,2; 0,7; 0,2 $DICT_{50}$/50 µl).

iv) Comenzando por la fila G y por la preparación de virus más diluida, se añaden 50 µl de virus a cada pocillo de esa fila. Esto se repite con cada dilución del virus, colocando la dilución con el título más alto en la fila A.

v) Las placas se cubren y se incuban a 37°C durante 1 hora.

vi) Se preparan células LT a partir de monocapas previamente cultivadas en una suspensión de $10^5$ células/ml en medio Eagle con antibióticos y suero fetal bovino al 2%. Después de la incubación de las placas de microtitulación, se añaden 100 µl de la suspensión celular a todos los pocillos, excepto a los pocillos H11 y H12, que sirven como pocillos control para el medio. Los restantes pocillos de la fila H son los controles de toxicidad celular y sérica.

vii) Las placas de microtitulación se cubren y se incuban a 37°C durante 9 días.

viii) A partir del cuarto día, se examinan diariamente las monocapas para comprobar si presentan ECP, utilizando un microscopio de inversión. En las células de la fila H no ha de haber ECP. Utilizando la cepa vacunal 0240 KSGP de capripoxvirus, la lectura final se toma el 9º día, y el título del virus en cada réplica de titulación se calcula según el método Kärber. Si se deja más tiempo, siempre se produce un cambio en el virus, de modo que el virus que al principio estaba neutralizado parece disociarse del anticuerpo.

ix) *Interpretación de los resultados:* El índice de neutralización es la diferencia entre el logaritmo del título vírico en un suero negativo y el del suero problema. Un índice ≥1,5 se considera positivo. La prueba puede hacerse más sensible si se examina el suero del mismo animal antes y después de la infección. Debido a que la inmunidad a la viruela ovina y caprina está predominantemente mediada por células, un resultado negativo, en particular después de la vacunación en la que la respuesta es necesariamente débil, no implica que el animal del que se ha obtenido el suero no esté protegido.

Se ha descrito un método en el que se mantiene constante el virus y varía el suero, con el que se utilizan diluciones del suero en un intervalo que va de 1/5 a 1/500 y células de músculo fetal bovino. Debido a que estas células tienen menor sensibilidad a los capripoxvirus que las células LT, el problema del cambio que se produce en el virus queda resuelto.

### 2.2. Prueba de inmunofluorescencia indirecta

Para la prueba de inmunofluorescencia indirecta, se pueden utilizar los cultivos de tejidos infectados con capripoxvirus cultivados sobre cubreobjetos o sobre portaobjetos para cultivo tisular. En la prueba se incluirán un control del cultivo celular sin infectar y los sueros control positivo y negativo. Los cultivos infectados y los cultivos control se fijan con acetona a –20°C durante 10 minutos y se guardan a 4°C. Se preparan diluciones de los sueros problema en PBS, comenzando con una dilución a 1/5, y los positivos se identifican utilizando una gammaglobulina anti-oveja conjugada con isocianato de fluoresceína (Davies & Otema, 1978). Pueden producirse reacciones cruzadas con el virus del ectima contagioso, con el de la estomatitis papular bovina y quizás con otros poxvirus.

### 2.3. Análisis por inmunoelectrotransferencia

El análisis por inmunoelectrotransferencia de los sueros problema frente a lisados de células infectadas por capripoxvirus proporciona un sistema sensible y específico para la detección del anticuerpo contra las proteínas estructurales de capripoxvirus, aunque la prueba es cara y difícil de llevar a cabo (Chand *et al.*, 1994).

### 2.4. Enzimoinmunoanálisis

No se dispone de ningún ELISA validado para el diagnóstico serológico ni del VVO ni del VVC.

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

## 1. Antecedentes

### 1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

Se han utilizado varias vacunas atenuadas e inactivadas contra capripoxvirus e inactivadas para la protección contra los virus de la viruela ovina y de la viruela caprina. Todas las cepas de capripoxvirus de origen ovino, caprino o bovino examinadas hasta ahora comparten un sitio de neutralización principal, de forma que los animales recuperados de la infección por una cepa son resistentes a la infección por cualquiera de las otras (Capstick, 1961). En consecuencia, es posible utilizar una sola cepa de capripoxvirus para proteger a las ovejas y a las cabras contra todas las cepas naturales del virus, con independencia de que su origen estuviera en Asia o África (Kitching *et al.*, 1986b; Kitching & Taylor, 1985). No obstante, las observaciones realizadas a nivel de campo indican que ciertas cepas son bastante específicas de hospedador, y solo se utilizan en ovejas contra el VVO o solo en cabras contra el VVC.

Una serie de cepas de capripoxvirus se han utilizado mucho como vacunas vivas (Davies & Mbugwa, 1985), como por ejemplo, las cepas Romanian y RM-65, que se utilizan básicamente en ovejas, y la Mysore y la Gorgan, que se utilizan en cabras. Recientemente, se ha comprobado que el virus de la viruela ovina y caprina de Kenia 0240 que se utiliza con frecuencia en una vacuna contra la viruela

ovina y caprina, en realidad es un VDNC (Tuppurainen *et al.,* 2014). La identidad y las propiedades de atenuación de la cepa vírica deben comprobarse y tenerse en cuenta a la hora de escoger las cepas vacunales que se utilizarán en ganado bovino, ovejas y cabras. La dosis protectora depende de la cepa vacunal utilizada. La inmunidad contra la viruela ovina y caprina en las ovejas y las cabras después de la vacunación con la cepa 0240 dura más de un año, y la cepa Romanian proporcionó protección durante al menos 30 meses.

Las vacunas muertas producidas a partir de cultivo tisular contienen solo el virión maduro intracelular del virus, y no el virión con envoltura extracelular, menos robusto pero biológicamente crucial. Como consecuencia, este tipo de vacuna no estimula la inmunidad contra el virión con envoltura extracelular, lo cual da lugar a una escasa protección. Las vacunas contra capripox muertas proporcionan como mucho una protección temporal.

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

Los requisitos generales establecidos para las instalaciones en las que se producen vacunas y para el mantenimiento de la documentación y registros a lo largo de todo el proceso de fabricación se describen en el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias.* La documentación debe incluir los procedimientos estandarizados de trabajo (PET) aplicables al método de fabricación y a cada paso del análisis de células y reactivos utilizados en el proceso, a cada lote y al producto final.

### 2.1. Características del inóculo

#### 2.1.1. Características biológicas

Una cepa de capripoxvirus utilizada en la producción de una vacuna debe ir acompañada de un historial en el que se describa su origen y su pase por cultivos de tejidos o por animales. Debe ser inocua para utilizarla en todas las razas de ovejas y cabras en las que se pretenda emplear, incluyendo los animales gestantes y los de corta edad. No debe ser transmisible, debe permanecer atenuada después del pase posterior por un cultivo tisular, y proporcionar una protección completa frente al desafío con cepas naturales virulentas durante un mínimo de un año. Será conveniente preparar una cantidad de inóculo original del virus vacunal y guardarlo con el fin de proporcionar un inóculo de trabajo constante para la producción regular de vacuna.

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

Cada inóculo original deben analizarse para garantizar su identidad y comprobar que está libre de virus extraños, en concreto pestivirus, como el virus de la enfermedad de la frontera o el virus de la diarrea vírica bovina, y libre de contaminación bacteriana, fúngica y/o micoplásmica. Los procedimientos generales para las pruebas de esterilidad/pureza se describen en el Capítulo 1.1.9. El inóculo original también debe ser inocuo y no debe producir reacción clínica en ninguna de las razas ovinas ni caprinas cuando se administra por la vía recomendada, y debe estimular una inmunidad completa frente al virus de la viruela ovina y caprina en todas las razas ovinas y caprinas durante al menos 1 año. Las pruebas de inocuidad y potencia necesarias se describen en el párrafo C.2.2.4 *Pruebas en los lotes de producto final*.

### 2.2. Método de fabricación

El método de fabricación debe documentarse como Resumen de la Producción.

#### 2.2.1. Procedimiento

El inóculo de vacuna debe liofilizarse y guardarse en viales de 2 ml a –20°C. Se puede guardar en estado húmedo a –20°C, pero de ser así, es más estable a –70°C o a una temperatura más baja. Para obtener un rendimiento óptimo, el virus debe cultivarse en células primarias o secundarias LT o LK de oveja lanar. También pueden utilizarse células Vero con cepas adecuadamente adaptadas.

Los lotes de vacuna se producen sobre monocapas frescas de células secundarias LT o de células primarias LK. Se reconstituye un vial de inóculo vírico con GMEM u otro medio apropiado y se inocula en una monocapa de células LT o LK, que previamente se ha lavado con PBS templado, y se permite la adsorción a 37°C durante 15 minutos a 37ºC antes de recubrir la mezcla con GMEM adicional. Transcurridos 4–6 días, deberá apreciarse un gran efecto citopático (80-90%). El cultivo deberá examinarse en busca de indicios de ECP no específico, turbidez o cambio en el pH del medio. Se congela y descongela el cultivo tres

veces, se recoge la suspensión y se centrifuga a 600 ***g*** durante 20 minutos. Puede requerirse un segundo pase para producir una cantidad de virus suficiente para obtener un lote de producción. Puede producirse vacuna viva sobre frascos rodillo.

Se repite el procedimiento y el producto obtenido de cada uno de los frascos numerados por separado se mezcla también por separado con un volumen igual de hidrolizado estéril de lactoalbúmina al 5% frío y sacarosa al 10%, y se transfiere a frascos numerados por separado para su conservación a –20°C. Antes se toman 0,2 ml de cada frasco para un control de esterilidad, y una muestra adicional de 0,2 ml para la titulación del virus. Se toman mezclas de 2 ml formadas por las muestras de 0,2 ml tomadas de los diez frascos. Debe conservarse un registro escrito de todos los procedimientos para todos los lotes de vacuna.

Las vacunas inactivadas se producen normalmente a partir de cepas naturales de capripoxvirus sin atenuar que han crecido en cultivos de tejidos como se ha descrito anteriormente, inactivadas con formaldehído al 0,03%, y mezcladas con un volumen igual de alhidrogel como adyuvante. Ya no se considera adecuado el formaldehído para la inactivación de ciertas vacunas víricas debido a que su modo de acción no puede garantizar que sea totalmente eficaz para la inactivación de todos los virus vivos. Este extremo no ha sido completamente investigado para capripoxvirus.

### 2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

La especificación y la fuente de todos los ingredientes utilizados en el proceso de fabricación deben documentarse, y debe comprobarse la ausencia de agentes extraños: bacterias, hongos, micoplasmas y cualquier otro virus. El procedimiento analítico se describe en detalle en el Capítulo 1.1.9. La utilización de antibióticos debe cumplir los requisitos de la autoridad correspondiente.

### 2.2.3. Controles durante el proceso

i) Células

Las células se obtendrán a partir de testículo o riñón de un cordero joven y sano de un rebaño libre de prurigo lumbar de una raza ovina lanar. Las células deben observarse durante el cultivo en busca de indicios de efecto citopático y de morfología normal (predominantemente fibroblásticas). Normalmente se pueden llevar a cabo con éxito hasta diez pases de estas células. Cuando estas se utilicen para la producción de vacunas, se realizarán paralelamente cultivos control sin infectar, y se mantendrán al menos durante tres pases más para su posterior observación. Se comprobará si contienen cepas de virus no citopáticos de la diarrea vírica bovina o de la enfermedad de la frontera mediante técnicas de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa. Si resulta posible, se hará una preparación de células y un cribado antes de la producción de la vacuna y se conservará en alícuotas de 1–2 ml que contengan $2 \times 10^7$ células/ml en una solución con un 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) y un 90% de FBS (suero fetal bovino) mantenida en nitrógeno líquido.

ii) Suero

El suero bovino utilizado en el medio de crecimiento o de mantenimiento deberá estar libre de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) y de anticuerpos contra capripoxvirus, y debe comprobarse que esté libre de contaminación con pestivirus o cualquier otro virus o bacterias, micoplasmas u hongos extraños.

iii) Medio

Debe comprobarse que el *medio* esté libre de contaminación por pestivirus o cualquier otro virus, bacterias, micoplasmas u hongos extraños.

iv) Virus

El virus de inóculo y la vacuna final deben titularse en tubos de cultivos celulares o en placas de microtitulación. En muestras de vacuna debe comprobarse si contienen de virus ajenos, incluyendo cepas de pestivirus citopáticas y no citopáticas, y deben mezclarse con un suero inmune contra capripoxvirus con un título alto que haya dado resultado negativo con relación a los anticuerpos contra pestivirus, con el fin de impedir que el virus vacunal mismo interfiera con la prueba. El material de la vacuna puede mantenerse a –20°C o menos temperatura hasta que se completen todas las pruebas de esterilidad y de titulación, y entonces se liofilizará en alícuotas de 1 ml en viales suficientes para

100 dosis. El producto vacunal diluido con hidrolizado de lactoalbúmina y sacarosa tendrá un título mínimo de $\log_{10}$ 4,5 $DICT_{50}$ por mililitro después de la liofilización, equivalente a una dosis de campo de $\log_{10}$ 2,5 $DICT_{50}$. Se lleva a cabo una titulación posterior en cinco viales de la preparación liofilizada, elegidos al azar para confirmar el título.

#### 2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad/pureza

Las pruebas de esterilidad y de ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario se detallan en el Capítulo 1.1.9.

ii) Inocuidad

La inocuidad debe comprobarse mediante estudios de vacunación estadísticamente válidos utilizando ovejas y cabras de corta edad seronegativas que se sepa que son sensibles al virus de la viruela ovina y caprina. El procedimiento descrito es adecuado para cepas vacunales como la 0240 que son igual de inmunógenas en ovejas que en cabras. La elección del animal de destino debe adaptarse a cepas con una preferencia de hospedador más restringida.

iii) Potencia

Deben realizarse pruebas de potencia si no se conoce la dosis mínima inmunizante de la cepa vírica. Esto se lleva a cabo mediante la comparación del título de un virus de desafío virulento en los costados de los animales vacunados y de los animales control. Después de la vacunación, se afeita la lana o el pelo del costado de al menos tres animales y de tres controles. Se preparan diluciones logarítmicas decimales del virus de desafío en PBS estéril, y se inoculan por vía intradérmica seis de estas diluciones (0,1 ml por inóculo) a lo largo de la longitud del flanco; inoculando adicionalmente cuatro réplicas de cada dilución verticalmente de arriba hacia abajo también en el flanco. Es posible que se desarrolle una inflamación edematosa en los 24 sitios de inoculación en los animales de control, aunque preferiblemente habrá poca reacción o ninguna en los cuatro sitios de los inóculos más diluidos. Dentro de las 24 horas los animales vacunados desarrollarán una reacción de hipersensibilidad inicial en los puntos de inoculación que disminuirá rápidamente. Pueden desarrollarse pequeñas zonas de necrosis en el punto de inoculación del virus de desafío más concentrado. La mácula/pápula se mide entre 8 y 10 días después del desafío. El título del virus de desafío se calcula tanto para los animales vacunados como para los animales control; se considera evidencia de protección una diferencia en el título de más de $\log_{10}$ 2,5.

### 2.3. Requisitos para la autorización

#### 2.3.1. Requisitos de inocuidad

i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

La vacuna debe ser inocua en todas las razas ovinas y caprinas en las que pretenda utilizarse, incluidos animales de corta edad o gestantes. Tampoco debe ser transmisible y permanecer atenuado tras un pase más por cultivo tisular.

Deben llevarse a cabo pruebas de inocuidad en el producto final de cada lote como se describe en el párrafo C.2.2.4.

La inocuidad de la vacuna en animales no de destino debe haberse demostrado utilizado ratones y cobayas como se describe en el párrafo C.2.2.4. No debe haber indicios de anatomopatología causada por la vacuna.

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas

La vacuna final escogida no debe revertir a la virulencia durante posteriores pases en las especies de destino.

iii) Consideraciones ambientales

La vacuna atenuada no debe poder perpetuarse autónomamente en poblaciones bovinas, ovinas ni caprinas. No deben utilizarse vacunas con la cepa 0240 en razas de *Bos taurus.* Las acepas de capripoxvirus no suponen un riesgo para la salud humana. No debe aplicarse ninguna otra precaución aparte de las descritas anteriormente en cuanto a esterilidad y ausencia de agentes extraños.

### 2.3.2. Requisitos de eficacia

i) Para la producción animal

La eficacia de la vacuna debe demostrarse en pruebas de vacunación de desafío en condiciones de laboratorio. Como se ha descrito en el apartado C.2.2.4.

Una vez se ha determinado la potencia de la cepa concreta que se está utilizando para producir la vacuna, en cuanto a dosis mínima necesaria para proporcionar inmunidad, no es necesario repetirlo en el producto final de cada lote, siempre que se haya determinado el título del virus presente.

ii) Para el control y la erradicación

La vacunación es la única forma eficaz de controlar los brotes de viruela ovina y caprina en países endémicos. Desafortunadamente, actualmente no se dispone de vacunas marcadoras que permitan diferenciar entre animales infectados y animales vacunados.

La inmunidad de las ovejas y de las cabras a los virus naturales virulentos después de la vacunación con la cepa 0240 dura más de 1 año, y la protección contra la infección generalizada después de la vacunación intradérmica dura al menos tres años, y es eficaz durante toda la vida. La duración de la inmunidad producida por otras cepas vacunales se establecerá en las ovejas y en las cabras mediante la realización de pruebas controladas en unas condiciones en las que no haya posibilidad de que las cepas naturales de capripoxvirus interfieran los resultados. Las vacunas inactivadas proporcionan inmunidad durante menos de 1 año, y por los motivos indicados al principio de este apartado, puede no conferir inmunidad contra la forma de capripoxvirus habitualmente asociada a la transmisión natural.

### 2.3.3. Estabilidad

A todas las vacunas se asigna inicialmente un periodo de validez de 24 meses antes de la fecha de caducidad. A continuación, se llevan a cabo pruebas de estabilidad en tiempo real para confirmar que la fecha de caducidad es adecuada. Deben volver a titularse múltiples lotes de la vacuna periódicamente a lo largo de todo el periodo de validez para determinar la variabilidad de la vacuna.

Las preparaciones de la vacuna de la viruela ovina y caprina adecuadamente liofilizadas, en particular aquellas que incluyen un protector como la sacarosa y el hidrolizado de lactoalbúmina son estables durante más de 25 años cuando se guardan a –20°C, y 2–4 años si se hace a 4°C. Hay pruebas de que son estables a temperaturas más altas, pero no se tiene constancia de experimentos controlados a largo plazo. Las vacunas inactivadas deben almacenarse a 4°C, y se les suele asignar un periodo de validez de 1 año.

Para la preparación liofilizada no se requiere ningún otro conservante, aparte de un protector, como la sacarosa o el hidrolizado de lactoalbúmina.

## 3. Vacunas basadas en la ingeniería genética

### 3.1. Vacunas disponibles y sus ventajas

Actualmente no se comercializa ninguna vacuna recombinante contra capripoxvirus. Sin embargo, se está desarrollando una nueva generación de vacunas contra la viruela ovina y caprina que utiliza el genoma de capripoxvirus como un vector para los genes de otros agentes patógenos de los rumiantes, como el virus de la peste de los pequeños rumiantes (PPR) (Berhe *et al.*, 2003; Tuppurainen *et al*., 2014).

### 3.2. Requisitos especiales para las vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética, si las hay

No es aplicable.

## BIBLIOGRAFÍA

BALINSKY C.A, DELHON G, SMOLIGA G, PRARAT M, FRENCH R.A, GEARY S.J, ROCK D.L & RODRIGUEZ L.L. (2008). Rapid preclinical detection of sheep pox virus by a real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.,* **46**, 438–442.

BERHE G., MINET C., LE GOFF C., BARRETT T., NGANGNOU A., GRILLET C., LIBEAU G., FLEMING M., BLACK D.N. & DIALLO A. (2003). Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste-des-petits-ruminants virus and capripoxvirus infections. *J. Virol*., **77**, 1571–1577.

BOWDEN T.R, BABIUK S.L, PARKYN G.R., COPPS J.S. & BOYLE D.B. (2008). Capripox virus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology* , **371**, 380–393.

CAPSTICK P.B. (1961). Annual Report. Kenya Veterinary Department, Kenya, 45–47.

CHAND P., KITCHING R.P. & BLACK D.N. (1994). Western blot analysis of virus-specific antibody responses to capripoxvirus and contagious pustular dermatitis infections in sheep. *Epidemiol. Infect*., **113**, 377–385.

DAS A., BABIUK S. & MCINTOSH M.T. (2012). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of capripoxviruses. *J. Clin. Microbiol*., **50**, 1613–1620.

DAVIES F.G. & MBUGWA G. (1985). The alterations in pathogenicity and immunogenicity of a Kenya sheep and goat pox virus on serial passage in bovine foetal muscle cell cultures. *J. Comp. Pathol*., **95**, 565–576.

DAVIES F.G. & OTEMA C. (1978). The antibody response in sheep infected with a Kenyan sheep and goat pox virus. *J. Comp. Pathol*., **88**, 205–210.

GELAYE E., LAMIEN C.E., SILBER R., TUPPURAINEN E.S., GRABHERR R. & DIALLO A.(2013). Development of a cost-effective method for capripoxvirus genotyping using snapback primer and dsDNA intercalating dye. *PLoS One*, **8** (10): e75971.

HEINE H.G., STEVENS M.P., FOORD A.J. & BOYLE D.B. (1999). A capripoxvirus detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32, the homolog of the vaccinia virus H3L gene. *J. Immunol. Methods*, **227**, 187–196.

IRELAND D.C. & BINEPAL Y.S. (1998). Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. *J. Virol. Methods*, **74**, 1–7.

KITCHING R.P., HAMMOND J.M. & TAYLOR W.P. (1986). A single vaccine for the control of capripox infection in sheep and goats. *Res. Vet. Sci.,* **42**, 53–60.

KITCHING R.P. & SMALE C. (1986). Comparison of the external dimensions of capripoxvirus isolates. *Res. Vet. Sci*., **41**, 425–427.

KITCHING R.P. & TAYLOR W.P. (1985). Clinical and antigenic relationship between isolates of sheep and goat pox viruses. *Trop. Anim. Health Prod*., **17**, 64–74.

LAMIEN C.E., LELENTA M., GOGER W., SILBER R., TUPPURAINEN E., MATIJEVIC M., LUCKINS A.G. & DIALLO A. (2011). Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses. *J. Virol. Methods*, **171**, 134–140.

LE GOFF C., LAMIEN C.E., FAKHFAFH E., CHADEYRAS A., ABU-ADULUGBAD E., LIBEAU G., TUPPURAINEN E., WALLACE D., ADAM T., SILBER R., GULYAZ V., MADANI H., CAUFOUR P., HAMAMMI S., DIALLO A. & ALBINA E. (2009). Capripoxvirus G-protein-coupled chemokine receptor, a host-range gene suitable for virus-animal origin discrimination. *J. Gen. Virol.*, **90**, 67–77.

MURRAY L., EDWARDS L., TUPPURAINEN E.S., BACHANEK-BANKOWSKA K., OURA C.A., MIOULET V. & KING D.P. (2013). Detection of capripoxvirus DNA using a novel loop-mediated isothermal amplification assay. *BMC Vet. Res*., **9**, 90.

OMOGA D.C.A., MACHARIA M., MAGIRI E., KINYUA J., KASIITI J. & HOLTON T. (2016) Molecular based detection, validation of a LAMP assay and phylogenetic analysis of capripoxvirus in Kenya. *J. Adv. Biol. Biotech.,* **7**, 1–12.

STUBBS S., OURA C.A., HENSTOCKA M., BOWDEN T.R., KING D.P. & TUPPURAINEN E.S. (2012). Validation of a high-throughput real-time polymerase chain reaction assay for the detection of capripoxviral DNA. *J. Virol. Methods*, **179** (2), 419–422.

TUPPURAINEN E.S.M., PEARSON C.R., BACHANEK-BANKOWSKA K., KNOWLES N.J., AMAREEN S., FROST L., HENSTOCK M.R., LAMIEN C.E., DIALLO A. & MERTENS P.P.C. (2014). Characterization of sheep pox virus vaccine for cattle against lumpy skin disease virus. *Antiviral Res*., **109** (100), 1–6.

ZHAO Z., FAN B., WU G., YAN X., LI Y., ZHOU X., YUE H., DAI X., ZHU H., TIAN B., LI J. & ZHANG Q. (2014) Development of loop-mediated isothermal amplification assay for specific and rapid detection of differential goat Pox virus and Sheep Pox virus. *BMC Microbiol.,* **14**, 1–10.

ZRO K., AZELMAT S., BENDOURO Y., KUHN J.H., EL FAHIME E. & ENNAJI M.M. (2014a). PCR-based assay to detect sheeppox virus in ocular, nasal, and rectal swabs from infected Moroccan sheep. *J. Virol. Methods*, **204**, 38–43.

ZRO K., ZAKHAM F., MELLOUL M., EL FAHIME E. & MUSTAPHA M. (2014b). A sheeppox outbreak in Morocco: isolation and identification of virus responsible for the new clinical form of disease. *BMC Vet Res*., **10**, 31.

*
* *

**NB:** Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la viruela ovina y la viruela caprina (puede consultarse la página web de la OIE: https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3)
Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para cualquier otro dato sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la viruela ovina y la viruela caprina.

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2017.