

VIRUELA DEL CAMELLO

RESUMEN

*La viruela del camello es una enfermedad vírica infecciosa muy extendida entre los camélidos del viejo mundo. Los camélidos del nuevo mundo también son susceptibles. La enfermedad tiene lugar en las zonas de cría de camellos de África, al norte del ecuador, de Oriente Medio y de Asia, con el consiguiente impacto económico por las pérdidas de producción y, a veces, por la mortalidad. La viruela del camello no tiene lugar en la población de camellos salvajes de Australia. El virus de la viruela del camello pertenece a la familia Poxviridae, subfamilia Chordopoxvirinae, género Orthopoxvirus. La enfermedad se caracteriza por la aparición de fiebre, lesiones generalizadas o locales por viruela en la piel y en las membranas mucosas de la boca y en los tractos respiratorio y digestivo. Los signos varían desde la infección asintomática a la infección sistémica leve, moderada y, con menos frecuencia, grave e incluso la muerte. La enfermedad se presenta con mayor frecuencia y gravedad en los animales de corta edad y en hembras gestantes. La transmisión se debe al contacto directo entre los animales infectados y susceptibles o a la infección indirecta por la contaminación del medioambiente. Se sospecha del papel de los insectos en la transmisión porque con frecuencia se observa que la enfermedad aparece después de las lluvias. El virus de la viruela del camello es específico de ese hospedador y no infecta a otros animales. En la región noreste de la India se describió en 2009 una infección por el virus de la viruela del camello en seres humanos asociada a brotes en dromedarios (*Camelus dromedarius*). Fue un incidente aislado que ilustra que el virus de la viruela del camello tiene poca importancia para la salud pública.*

Identificación del agente: *El diagnóstico provisional de la infección por la viruela del camello se basa en los signos clínicos. No obstante, se cree que las infecciones de camellos que cursan con ectima contagioso (orf), el virus del papiloma y la reacción a las picaduras de los insectos son diagnósticos diferenciales en las primeras fases clínicas y en los casos leves de la viruela del camello. Se dispone de varios métodos de diagnóstico, y donde sea posible, se debe utilizar más de uno para el diagnóstico confirmativo de la enfermedad.*

El método más rápido de confirmación laboratorial de la viruela del camello es la observación de los viriones característicos del ortopoxvirus con forma de ladrillo en las lesiones de la piel, las costras, o las muestras de tejido mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). El virus de la viruela del camello es claramente distinto del parapoxvirus de forma ovoide, que es el agente etiológico del principal diagnóstico diferencial: el orf del camello. Sin embargo, pueden observarse los dos virus de forma simultánea mediante MET, a modo de infecciones duales.

La viruela del camello puede confirmarse mediante la detección del antígeno de la viruela del camello en las costras y en las lesiones del tejido producidas por la viruela utilizando inmunohistoquímica. Es un método relativamente sencillo que puede realizarse en los laboratorios que no disponen de MET. Además, las muestras parafinadas pueden guardarse durante un largo periodo de tiempo, lo que permite la realización de futuros estudios epidemiológicos con carácter retrospectivo.

El virus de la viruela del camello se puede propagar en la membrana corioalantoidea (MCA) de huevos embrionados de pollo. Después de 5 días, se pueden observar las lesiones típicas de la MCA. El virus de la viruela del camello produce el típico efecto citopático en una gran variedad de cultivos celulares. Pueden observarse cuerpos de inclusión eosinófila e intracitoplasmáticos, característicos de la infección por poxvirus en células infectadas mediante la tinción con hematoxilina y eosina. Se puede confirmar la presencia del ácido nucleico vírico mediante la reacción en cadena de la polimerasa, y se pueden identificar diferentes cepas del virus de la

viruela del camello mediante el análisis del ADN con enzimas de restricción. Se ha descrito un enzimoimmunoanálisis (ELISA) de captura del antígeno para la detección del virus de la viruela del camello.

Pruebas serológicas: Existe una amplia gama de pruebas serológicas para la identificación de la viruela del camello, como la neutralización del virus y el ELISA.

Requisitos para las vacunas: Se comercializan tanto vacunas atenuadas como inactivadas. La vacunación con la vacuna atenuada proporciona protección durante al menos 6 años, y con la inactivada, durante 12 meses.

A. INTRODUCCIÓN

La viruela del camello ocurre en casi todos los países en los que existe la cría de camellos, además del dromedario introducido en Australia y los tilópodos (la llama y otras especies relacionadas) de Sudamérica. Se ha informado de brotes de la enfermedad en Oriente Medio (Bahrain, Irán, Iraq, Omán, Arabia Saudita, Emiratos Árabes Unidos y Yemen), en Asia (Afganistán y Pakistán), en África (Argelia, Egipto, Etiopía, Kenia, Mauritania, Marruecos, Níger, Somalia y Sudán) (Mayer & Czerny, 1990; Wernery *et al.*, 1997b) y en zonas del sur de Rusia y en la India. La enfermedad es endémica en esos países y está sujeta a un patrón de brotes esporádicos que aumentan durante la estación lluviosa.

La viruela del camello está causada por el virus *Orthopoxvirus cameli*, que pertenece al género *Orthopoxvirus*, de la familia *Poxviridae*. En base al análisis de las secuencias, se ha determinado que el virus de la viruela del camello es el que más estrechamente se relaciona con el virus variola, que es el agente etiológico de la viruela. Se han vacunado camellos de forma eficaz contra la viruela del camello con cepas del virus vaccinia. El tamaño medio del virus es de 265–295 nm. Los ortopoxvirus poseen una envoltura, tienen forma de ladrillo y la membrana exterior está cubierta de proteínas tubulares dispuestas de forma irregular. Un virión consta de una envoltura, una membrana externa, dos cuerpos laterales y un núcleo. El ácido nucleico es un ADN lineal bicatenario. El virus se replica en el citoplasma de la célula hospedadora, en los denominados cuerpos de inclusión. El virus de la viruela del camello hemoaglutina eritrocitos de gallo joven. No obstante, la hemoaglutinación puede ser escasa (Davies *et al.*, 1975). El virus de la viruela del camello es resistente al éter y sensible al cloroformo (Davies *et al.*, 1975; Tantawi *et al.*, 1974). También es sensible al pH 3–5 y pH 8,5–10 (Davies *et al.*, 1975). Los virus de la viruela son susceptibles a varios desinfectantes, incluido el hipoclorito sódico al 1%, el hidróxido de sodio al 1%, el ácido peracético al 1%, el formaldehído, la formalina al 0,5–1% y los compuestos de amonio cuaternario al 0,5%. El virus puede destruirse al autoclave, hirviéndolo 10 minutos, y se elimina con rayos ultravioleta (longitud de onda de 245 nm) en unos pocos minutos (Coetzer, 2004).

Normalmente, el periodo de incubación es de entre 9 y 13 días (oscila entre 3 y 15 días). Los signos clínicos de la viruela del camello varían desde las infecciones locales latentes y leves, que afectan sólo a la piel, hasta los signos clínicos moderados o graves, que posiblemente reflejan las diferencias existentes entre las cepas de la viruela del camello o las diferencias entre los estados inmunitarios cada animal (Wernery & Kaaden, 2002). La enfermedad se caracteriza por la fiebre, el agrandamiento de los nódulos linfáticos y las lesiones cutáneas. Estas últimas aparecen entre 1 y 3 días después del comienzo de la fiebre, manifestándose al principio como máculas edematosas, y transformándose luego en pupas y en ampollas para convertirse finalmente en pústulas. Tras su ruptura, las pústulas se convierten en costras. Estas lesiones aparecen en primer lugar en la cabeza, los párpados, las fosas nasales y los bordes de las orejas. En los casos graves, puede hincharse toda la cabeza. Más tarde, las lesiones cutáneas pueden extenderse al cuello, las patas, los genitales, las glándulas mamarias y el periné. En caso de presentarse de forma generalizada, las lesiones debidas a la viruela pueden extenderse por todo el cuerpo. Las lesiones cutáneas pueden tardar entre 4 y 6 semanas en curarse. En la variante sistémica de la enfermedad, las lesiones variolosas pueden observarse en las mucosas de la boca y del aparato respiratorio (Kritz, 1982; Wernery & Kaaden, 2002).

Los animales pueden presentar salivación, lagrimeo y rinorrea mucopurulenta. En la forma sistémica de la enfermedad pueden presentarse diarrea y anorexia. Es posible que las hembras gestantes aborten. La muerte normalmente se debe a infecciones secundarias y a septicemia (Wernery & Kaaden, 2002).

El examen histopatológico de los primeros nódulos cutáneos revela una hinchazón citoplasmática típica, y la vacuolización y redondeo de los queratinocitos del estrato espinoso externo. La rotura de estas células produce ampollas y edema localizado. Se produce la infiltración perivascular de las células mononucleares y la infiltración variable de los neutrófilos y los eosinófilos. Puede presentarse una hiperplasia epitelial pronunciada en los bordes de las lesiones cutáneas (Yager *et al.*, 1991).

Sólo existen unas pocas descripciones detalladas de anatomopatología de la viruela del camello. Las lesiones observadas en el examen post mórtem de los camellos que mueren tras una infección grave por la viruela del

camello son lesiones múltiples similares a las de la viruela en las mucosas de la boca y del aparato respiratorio. Las lesiones pulmonares pueden tener un diámetro de entre 0,5 y 1,3 cm, y, en ocasiones, de hasta 4 o 5 cm. Las lesiones de menor tamaño pueden tener un centro hemorrágico. Las lesiones pulmonares se caracterizan por una degeneración hidrópica, proliferación de las células epiteliales de los bronquios e infiltración de las zonas afectadas por macrófagos, necrosis y fibrosis (Kinne *et al.*, 1998; Pfeffer *et al.*, 1998a; Wernery *et al.*, 1997a). También se observan lesiones causadas por la viruela en la mucosa traqueal y en la retina, que causan ceguera.

La tasa de morbilidad de la viruela del camello es variable y depende del grado de circulación del virus dentro del rebaño. Los análisis serológicos llevados a cabo en varios países revelan la existencia de una gran prevalencia de anticuerpos frente a la viruela del camello (Wernery & Kaaden, 2002). La incidencia de la enfermedad es mayor en los machos que en las hembras y la tasa de mortalidad es mayor en los animales de corta edad que en los adultos (Kritz, 1982). En estos últimos, dicha tasa se sitúa entre el 5% y el 28%, y en los de corta edad, entre el 25% y el 100% (Mayer & Czerny, 1990).

La transmisión tiene lugar por el contacto directo entre animales infectados y animales susceptibles o por la infección indirecta por la vía de la contaminación medioambiental. Normalmente, la infección se adquiere por inhalación o a través de rozaduras cutáneas. El virus se excreta a través de la leche, la saliva, el lagrimeo y la rinorrea. Las costras secas desprendidas de las lesiones variólicas pueden contener virus vivos durante al menos 4 meses y contaminar el medio ambiente. Se ha sospechado del papel de los artrópodos como vectores en la transmisión de la enfermedad. El virus de la viruela del camello se ha detectado mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) y el aislamiento del virus en la garrapata del camello, *Hyalomma dromedarii*, recogida de los animales infectados con el virus de la viruela del camello. El aumento de la población de garrapatas durante la estación lluviosa puede influir en la propagación de la enfermedad (Wernery *et al.*, 1997a). Sin embargo, pueden estar implicados otros posibles vectores, como las moscas picadoras y los mosquitos.

Se ha sugerido que la virulencia del virus de la viruela del camello puede depender de la cepa (Wernery & Kaaden, 2002). El análisis del ADN mediante enzimas de restricción permite la comparación de las cepas. No obstante, hasta la fecha no se ha demostrado la existencia de diferencias con respecto a la cepa vacunal (Wernery *et al.*, 1997a).

La inmunidad frente a la viruela del camello es de tipo humoral y celular. No se conoce de forma exhaustiva la importancia proporcional de estos dos mecanismos, pero se cree que los anticuerpos en circulación no reflejan el estado inmunológico del animal (Wernery & Kaaden, 2002). Tras la infección, se adquiere inmunidad de por vida. La vacuna viva atenuada proporciona una protección frente a la enfermedad durante al menos 6 años, o probablemente más (Wernery & Zachariah, 1999). La vacuna inactivada proporciona protección sólo durante 1 año.

El virus de la viruela del camello es muy específico del hospedador y no infecta a otras especies animales, como el ganado vacuno, las ovejas o las cabras. El virus de la viruela del camello se clasifica en el Grupo 2 de Riesgo de infección humana y debe manipularse aplicando las medidas correspondientes, que se describen 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*. Las medidas de biocontención deben determinarse mediante un análisis del riesgo, como se describe en el Capítulo 1.1.4. Se han descrito varios casos humanos (Kritz, 1982); el más reciente en la India (Bera *et al.*, 2011), con signos clínicos como pápulas, vesículas, ulceración y, por último, costras en los dedos y las manos. No obstante, estos casos, así como infecciones humanas incluso más leves, parecen ser muy infrecuentes, lo cual indica que el virus de la viruela del camello tiene poca importancia para la salud pública.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la viruela del camello 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						
TEM	–	–	n/a	+++	–	–
Aislamiento del virus en cultivo celular	–	–	n/a	+++	–	–
Aislamiento del virus en membrana corioalantoidea de huevos de gallina embrionados	–	–	n/a	+++	–	–
Inmuno-histoquímica	–	–	n/a	+++	–	–
PCR	–	–	n/a	+++	–	–
PCR en tiempo real	–	–	n/a	+++	–	–
Detección de la respuesta inmunitaria						
ELISA	+++	+++	n/a	+	+++	+++
Neutralización del virus	+++	+++	n/a	+	+++	+++

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; n/a = no es aplicable.

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.

TEM: Microscopía electrónica de transmisión; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; ELISA = enzimoanálisis.

Durante la fase virémica de la enfermedad (una semana desde la aparición de los signos) se puede aislar el virus de la viruela del camello en cultivos celulares a partir de muestras de sangre heparinizada, o se puede detectar el ADN vírico mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de sangre en EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). Las muestras de sangre deben recogerse de forma estéril mediante punción en vena. Las muestras de sangre con anticoagulante para el aislamiento vírico a partir de la capa de células leucocitarias deben colocarse de inmediato en hielo y procesarse lo antes posible. En la práctica, se pueden guardar las muestras a 4°C hasta 2 días antes que se procesen, pero no se deben congelar ni mantener a temperatura ambiente.

La sangre obtenida para las muestras de suero debe recogerse en tubos sin anticoagulante. Los tubos de sangre deben mantenerse a temperatura ambiente durante 4–8 horas hasta que empiece a contraerse el coágulo, tras lo cual se centrifuga la sangre a 1.000 g durante 10 o 15 minutos. Se puede recoger con una pipeta el suero separado, manteniéndolo a 4°C durante un corto periodo de tiempo o guardándolo a –20°C.

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

Se deben recoger como mínimo 2 g de tejido procedente de las biopsias cutáneas y de los órganos utilizados para el aislamiento del virus y la histopatología. Para la PCR, se deben colocar unos 30 o 50 mg de muestra de tejido en un criotubo, o un recipiente similar, y se deben mantener a 4°C para el transporte y guardar a –20°C hasta su procesamiento. Las muestras de tejido recogidas para el aislamiento del virus deben guardarse en un medio de transporte de virus, como caldo de triptosa tamponado con Tris o medio mínimo esencial (MEM) sin suero fetal bovino (FCS), deben mantenerse a 4°C para el transporte y deben guardarse a –80°C hasta su procesamiento. El material para histología debe colocarse, inmediatamente después de su recogida, en un volumen de formalina al 10 % diez veces superior al volumen de la muestra. El tamaño de las muestras no debe sobrepasar los 0,5 cm x 1–2 cm. Las muestras conservadas en formalina pueden transportarse a temperatura ambiente.

1. Identificación del agente

1.1. Microscopía electrónica de transmisión

La MET es un método rápido de observación del virus de la viruela del camello en las costras o las muestras de tejido. No obstante, para obtener un diagnóstico positivo se requiere una concentración relativamente grande del virus en la muestra, y el virus de la viruela del camello no puede ser diferenciado de otras especies de ortopoxvirus. Sin embargo, actualmente, la MET es el mejor método para diferenciar los casos clínicos de viruela del camello y los de orf causados, respectivamente, por el virus de la viruela del camello y el parapoxvirus, aunque esos virus sí pueden diferenciarse mediante técnicas serológicas y mediante la PCR (Mayer & Czerny, 1990).

1.1.1. Preparación de la muestra

La muestra debe tener un tamaño de al menos 30–50 mg. Se trituran las costras o la muestra de tejido con una cuchilla desechable o con tijeras y pinzas estériles. Se tritura la muestra en cinco veces su volumen de una solución salina tamponada con fosfato (PBS) con antibióticos (tales como 10⁵ de unidades internacionales [UI] de penicilina y 10 mg de estreptomina por ml) en un mortero con arena estéril. Se transfiere la muestra a un tubo de centrifuga y se congela y descongela tres veces para liberar el virus de las células. Se agitan las muestras con vórtex mientras se descongelan. Se colocan los tubos en hielo y se sonicán durante 30 segundos a 80 Hz. Se centrifugan a 1.000 **g** durante 10 minutos para separar las partículas macroscópicas y recoger el sobrenadante (Pfeffer *et al.*, 1996; 1998b).

1.1.2. Procedimiento analítico

Se colocan 10 µl del mencionado sobrenadante en rejillas cubiertas con poli-L-lisina y se incuban a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se elimina el líquido con un papel de filtro para la cromatografía. Se añade una gota de ácido fosfo-túngstico al 2% (diluido en agua estéril y ajustando el pH a 7,2 con NaOH) a la rejilla, se incuban a temperatura ambiente durante 5 minutos y se seca al aire. Se examina la rejilla mediante MET (Pfeffer *et al.*, 1996; 1998b).

El virus de la viruela del camello tiene una forma típica de ladrillo con proteínas tubulares de superficie dispuestas de forma irregular. Los parapoxvirus son ligeramente más pequeños, con forma ovoide, y las proteínas de superficie están dispuestas de forma regular.

1.2. Aislamiento del virus en cultivos celulares

El virus de la viruela del camello puede propagarse en una gran variedad de cultivos celulares, como las siguientes líneas celulares: Vero, riñón de mono MA-104 y MS, riñón de hámster lactante (BHK) y piel de camello Dubai (Dubca), y los siguientes cultivos primarios de células: testículo de cordero, riñón de cordero, riñón de embrión de camello, riñón de ternero y fibroblastos de embrión de pollo (Davies *et al.*, 1975; Tantawi *et al.*, 1974).

Se preparan las muestras para el aislamiento del virus tal como se describe en el apartado B.1.1.1.

1.2.1. Procedimiento analítico

Se incuban 400 µl del sobrenadante durante 1 hora a temperatura ambiente y durante toda la noche a 4°C. Se filtra el sobrenadante con un filtro de 0,45 µm y se inocula en un frasco de 25 cm² que contenga células confluyentes. Se enjuaga el filtro con 0,5 ml del medio de mantenimiento utilizado en el cultivo celular y se incuban los frascos a 37°C durante 1 hora. Se añaden al frasco 6–7 ml de medio fresco y se continúa con la incubación durante unos 10 días. Ante cualquier sospecha de contaminación fúngica, debe descartarse el medio contaminado y

deben añadirse 5 µg/ml de anfotericina B a un medio nuevo. Deben observarse los frascos a diario durante 10–12 días.

A las 24 horas de la inoculación, puede aparecer el típico efecto citopático (ECP) en las placas, con la aparición de focos de células redondeadas, separación de células, formación de células gigantes y sincitios. Estos pueden contener hasta 20–25 núcleos (Tantawi *et al.*, 1974). El crecimiento del virus de la viruela del camello en un cultivo celular puede confirmarse mediante la MET, la PCR o el enzoinmunoanálisis (ELISA) de captura de antígeno (Johann & Czerny, 1993).

1.3. Aislamiento del virus en la membrana corioalantoidea de huevos embrionados de pollo

El virus de la viruela del camello se puede aislar en la membrana corioalantoidea (MCA) de huevos embrionados de pollo de 11–13 días. Los huevos deben incubarse a 37°C y, a los 5 días, los huevos que contengan embriones vivos se abren y se examina la MCA para comprobar si presentan lesiones en forma de pústulas: pústulas densas y blanco-grisáceas. El virus de la viruela del camello no causa la muerte en los huevos embrionados de pollo. La temperatura máxima para la formación de lesiones pustulosas es de 38,5°C. Si los huevos se incuban a 34,5°C, las pústulas son más planas y puede aparecer un centro hemorrágico (Tantawi *et al.*, 1974).

1.4. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es un método relativamente rápido para la detección del virus de la viruela del camello y puede utilizarse en lugar de la microscopía electrónica para establecer un diagnóstico provisional (Nothelfer *et al.*, 1995). Es probable que cualquier anticuerpo policlonal contra el virus vaccinia produzca resultados razonables con esta prueba debido a la amplia homología existente entre los virus vaccinia y los de la viruela del camello (Nothelfer *et al.*, 1995).

1.4.1. Procedimiento analítico

En Kinne *et al.* (1998) y en Pfeffer *et al.* (1998b) se describe el siguiente procedimiento inmunohistoquímico. Debe recogerse la pústula cutánea entera para el examen inmunohistoquímico. Se fija el tejido con formalina al 10%, se deseca pasándolo por una serie de alcoholes y se incluye en cera parafinada según los procedimientos histopatológicos estandarizados. Se preparan cortes de aproximadamente 3 µm y se colocan en los portaobjetos de vidrio. Se tratan los cortes desparafinados y deshidratados con 3% H₂O₂, preparado en agua destilada, durante 5 minutos y se lavan con PBS. Se incuban los portaobjetos durante 60 minutos a 37°C con anticuerpos monoclonales 5B4² diluidos al 1/500 frente al virus vaccinia. Se retiran los anticuerpos monoclonales lavando dos veces con PBS frío. Se incuban los portas durante 30 minutos con anticuerpos anti anticuerpos de ratón marcados con biotina. Se lavan con PBS durante 5 minutos y se incuban con estreptavidina-peroxidasa durante 30 minutos. Se lavan de nuevo con PBS durante 5 minutos y se añade diaminobenzidina como cromógeno durante 10 minutos.

1.5. Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR es un método rápido y sensible para la detección del ADN ortopoxvírico. Se han descrito varios métodos de PCR basada en gel para la detección del ADN del virus de la viruela del camello (Balamurugan *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 1994; 1997; Ropp *et al.*, 1995). Una PCR genérica, descrita por Meyer *et al.* (1994), permite la detección y diferenciación de las especies del género *Orthopoxvirus* en base a los diferentes tamaños de los amplicones. Utilizando el par de cebadores 5'-AAT-ACA-AGG-AGG-ATC-T-3' y 5'-CTT-AAC-TTT-TTC-TTT-CTC-3', se amplificará la secuencia de genes codificadora de la proteína de inclusión de tipo A (ATIP). El tamaño del producto de la PCR, específico para el virus de la viruela del camello, es de 881 pb.

1.5.1. Procedimiento analítico de la PCR basada en gel

Se suspende una pequeña alícuota de las formaciones costrosas en 90 µl de solución de lisis (Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, Na₂ EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, dodecilsulfato de sodio al 1%) y se añaden 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml, Invitrogen). Se digiere la muestra durante 10 minutos a 37°C antes de desintegrar la costra o el tejido con un mango para tubo de microcentrífuga.

2 El anticuerpo monoclonal 5B4 está disponible comercialmente. Para obtener más información, comuníquese con el Laboratorio de Referencia de la OIE (consulte la Tabla en la Parte 4 de este Manual Terrestre o consulte el sitio web de la OIE para obtener la lista más actualizada).

Se añaden otros 350 µl de la solución de lisis y 50 µl de proteinasa K, se mezcla con suavidad y se incuba durante 3 horas a 37°C. Se extrae la suspensión lisada con un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1) y se centrifuga a 8.000 **g** a 4°C durante 1 minuto. Se recoge la fase acuosa superior y se mezcla de nuevo con idéntico volumen de fenol/cloroformo/ alcohol isoamílico (25/24/1). Se centrifuga a 8.000 **g** a 4°C durante 1 minuto y se transfiere la fase acuosa superior a un nuevo frasco. Se precipita el ADN añadiendo un volumen 1/10 de acetato de sodio 3 M y dos volúmenes de etanol absoluto enfriado en hielo. Se coloca la muestra a -70°C durante 30 minutos o a -20°C durante toda la noche. Se centrifuga a 15.000 **g** durante 5 minutos a 4°C. Se desecha el sobrenadante y se lava el precipitado con 0,5 ml de etanol al 70%. Se centrifuga a 15.000 **g** durante 5 minutos. Se desecha el sobrenadante y el precipitado se seca al aire. Este se resuspende en 10 µl de agua libre de nucleasa. Como alternativa, el ADN puede extraerse empleando kits comerciales de extracción de ADN.

La amplificación del ADN se lleva a cabo en un volumen final de 50 µl que contenga 2 µl de cada dNTP, cada cual a una concentración de 10 mM, 5 µl de tampón 10 x para PCR, 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 1 µl de cada cebador, 2,5 U de ADN polimerasa Taq, 1 µl de ADN molde y un volumen adecuado de agua libre de nucleasa.

Se incuban las muestras en un termociclador: primer ciclo: 5 minutos a 94°C (paso inicial de desnaturalización); segundo ciclo: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 45°C y 2,5 minutos a 72°C. Se repite el segundo ciclo 29 veces. Último ciclo: 10 minutos a 72°C (paso final de elongación) y se mantiene a 4°C hasta el análisis.

Se mezclan 10 µl de una muestra con una solución de tinte de carga y se carga en gel de agarosa al 1% en tampón TBE (Tris/Borato/EDTA) que contenga bromuro de etidio o tinción cianina para ácido nucleico. Se carga una vía paralela con un ADN marcador de 100 pb. Se separan los productos a 100 V durante 30–40 minutos y se observan mediante un transiluminador de UV. Se confirman las reacciones positivas según el tamaño.

Se ha desarrollado un kit comercial para la PCR que permite la detección de ADN de ortopoxvirus y contiene un segundo sistema “convencional” de amplificación que consta de cebadores para el gen de la hemaglutinina (HA) del ortopoxvirus. Se puede secuenciar e identificar el amplicón mediante su comparación con las secuencias de ortopoxvirus ya existentes.

1.6. PCR en tiempo real

Se suspende una pequeña cantidad de muestra (sangre, lesión cutánea, o tejido) en 200 µl de tampón de lisis y 20 µl de proteinasa K, y se incuba a 65°C durante 1 hora. La muestra lisada se extrae con un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifuga a 8.000 **g** durante 10 minutos. La fase acuosa superior se transfiere a un tubo limpio y el ADN se precipita añadiendo 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Esta mezcla se deja a 20°C durante 1 hora y a continuación se centrifuga a 13.000 **g** durante 10 minutos. El sobrenadante se desecha y el precipitado se lava con 0,5 ml de etanol al 70%. El precipitado de ADN seco se vuelve a suspender en 30 µl de agua libre de nucleasa. Como alternativa, el ADN puede extraerse con kits comerciales de extracción de ADN.

Para la estandarización de la PCR, el ADN extraído del virus purificado se utiliza para amplificar un producto de 166 pb del gen HA del genoma del virus de la viruela del camello. Se ejecuta la PCR con una mezcla de reacción de 20 µl que contenga 2 µl de tampón para reacción de PCR 10x, 1,6 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,4 µl de dNTP, cada cual a una concentración de 10 mM, 0,4 µl de polimerasa Taq, 5 unidades/µl, 2 µl de ADN (unos 50–100 ng), 6 pmol de cada cebador y 2,5 pmol de cada sonda.

Las condiciones de ciclado son las siguiente:

Paso	Temp.	Tiempo	Modo de adquisición	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos		1
Amplificación	95°C	10 segundos		
	60°C	20 segundos simple	Simple	40

Paso	Temp.	Tiempo	Modo de adquisición	Nº de ciclos
Mezcla	95°C	00 ³	Continuo	1
	60°C	30 segundos		
	95°C	00 ³		

El resultado positivo es una amplificación que dé un valor de ciclo umbral (Ct) de 37 o menos.

2. Pruebas serológicas

Todos los virus del género *Orthopoxvirus* pueden provocar reacciones serológicas. No obstante, dentro de ese género, solo el virus de la viruela del camello puede causar las lesiones características de una viruela. El parapoxvirus y el virus de la viruela del camello no tienen reacciones cruzadas y, por tanto, las infecciones por viruela del camello y por el orf del camello pueden diferenciarse serológicamente. La mayor parte de las pruebas serológicas convencionales requieren mucho tiempo y trabajo, lo que las hace inadecuadas para un diagnóstico primario. Sin embargo, las pruebas serológicas constituyen una valiosa herramienta para las pruebas secundarias de confirmación y para los estudios epidemiológicos retrospectivos en aquellas zonas en las que no se vacuna contra la viruela del camello.

2.1. Prueba de neutralización del virus

En este método, los sueros se titulan frente a un título constante del virus de la viruela del camello (100 DICT₅₀ [dosis infectiva en el 50% del cultivo de tejido]) en células Vero.

2.1.1. Procedimiento analítico

- i) Se inactivan los sueros a 56°C durante 30 minutos en un baño de agua.
- ii) Los sueros se diluyen creando una serie de diluciones a la mitad en medio de cultivo celular sin suero utilizando una placa de microtitulación de grado cultivo celular de 96 pocillos de fondo plano (volúmenes de 25 µl). En cada prueba también deben incluirse suero problema control, además de sueros control negativos y positivos.
- iii) Se prepara una dilución de virus reserve que contenga 100 DICT₅₀ por 25 µl, empleando medio de cultivo celular libre de suero, que contenga antibióticos.
- iv) Se añaden 25µl de la dilución de virus reserve apropiada a cada uno de los pocillos con 25 µl de dilución del suero, excepto los pocillos con suero problema control y los pocillos control de cada placa.
- v) Las placas se cubren e incuban durante 1 hora a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂.
- vi) Se prepara una suspensión celular a partir de células Vero de 3-4 días empleando una concentración que asegure monocapas confluentes en los pocillos de la placa de microtitulación 18–24 horas tras la siembra.
- vii) Se añade un volumen de 100 µl de suspensión celular a cada pocillo, las placas se sellan con cinta adhesiva y se incuban a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ durante 3–4 días.
- viii) Las placas se examinan al microscopio para comprobar si presentan ECP, y los resultados se registran en una hoja de trabajo. Los pocillos se califican como positivos a la neutralización del virus si ha quedado intacto el 100% de la monocapa celular. La dilución más alta del suero que dé lugar a una neutralización completa del virus (ausencia de ECP) en la mitad de los pocillos problema es el título a punto final del 50% de ese suero. Si es necesario, el título se puede determinar por el método de Spearman–Kärber. Un título de 1/8 o superior se considera positivo.

3 Este paso es continuo, es decir, la temperatura aumenta hasta 95°C y a continuación disminuye hasta 60°C durante 30 segundos, y después aumenta de nuevo hasta 95°C antes de que el ciclo finalice.

2.2. Enzoinmunoanálisis para la detección de anticuerpos contra el virus de la viruela del camello

En Azwai *et al.* (1996) y en Pfeffer *et al.* (1998b) se describe el siguiente procedimiento para el ELISA de anticuerpos para *Orthopoxvirus cameli*. En la siguiente descripción se ofrecen las directrices generales para el procedimiento de la prueba.

2.2.1. Preparación del antígeno

- i) Se recoge el cultivo celular cuando está infectado al 100% con el virus de la viruela del camello. Se congela y descongela dos o tres veces. Se sonica durante 30 segundos a 80 Hz en hielo para liberar el virus de las células.
- ii) Se centrifuga a 1.000 **g** durante 10 minutos y se recoge el sobrenadante.
- iii) Se centrifuga el sobrenadante a 45.000 **g** a 4°C durante 1 hora. Se resuspende el precipitado en PBS.
- iv) Se añade NaCl a una concentración final de 330 mM y polietilenglicol (PEG 6000) a una concentración final del 7%.
- v) Se agita toda la noche a 4°C, se centrifuga a 3.000 **g** a 4°C durante 10 minutos y se lava el precipitado dos veces con NaCl 15 mM.
- vi) Se congela y descongela, y se trata con detergente no iónico al 1% (Nonidet P40, Sigma) a 37°C durante 3 horas.
- vii) Se congela y descongela y se centrifuga a 3.000 **g** durante 10 minutos a 4°C.
- viii) Se recoge el sobrenadante y se dializa al menos tres veces frente a PBS.
- ix) Se mide la concentración de proteína tal como se describe en Lowry (1951).
- x) Se guardan las alícuotas a –20°C.

2.2.2. Preparación de anticuerpo anti Ig de camello generado en ratón y conjugado a peroxidasa de rábano

No se dispone en el mercado anticuerpo anti Ig de camello generado en ratón y conjugado a peroxidasa de rábano. Los métodos para producir anticuerpos monoclonales anti IgM e IgG de camello han sido descritos por Azwai *et al.* (1995). Sin embargo, el anticuerpo anti Ig de camello generado en conejo y conjugado a peroxidasa de rábano puede remplazarse por un producto comercial que consiste en un conjugado de peroxidasa de rábano y proteína A de *Staphylococcus aureus*.

- i) Se precipitan los sueros de camello dos veces añadiendo sulfato amónico saturado a una concentración final del 40% (v/v) (29,6% de sulfato amónico [p/v]) a temperatura ambiente. Se centrifuga a 12.000 **g** durante 15 minutos y se disuelve en PBS, pH 7,2. Se dializa frente a varios cambios de PBS durante toda la noche.
- ii) Se separan las inmunoglobulinas utilizando la cromatografía de filtración en gel: se puede utilizar una columna ACA-34 (LBK) (2,6 × 100 cm) para separar las inmunoglobulinas precipitadas con sal (IgM e IgG) según su tamaño. La elución puede realizarse con PBS a 20 ml/hora y pueden recogerse fracciones de 6 ml. Se establecen las concentraciones de proteína por absorbancia a 280 nm.

2.2.3. Producción de antisuero

Se inmuniza a conejos con una inyección subcutánea de IgG de camello emulsionada con un adyuvante adecuado. Se debe inmunizar a los animales tres veces para estimular la producción de anticuerpos. Se recoge el suero y se guarda a –20°C hasta su uso.

2.2.4. Procedimiento analítico

- i) Se recubren las placas de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno preparado a 1 µg/ml en tampón carbonatado/bicarbonatado 0,05 M, pH 9,6 (100 µl por pocillo).
- ii) Se incuban las placas de ELISA en una cámara húmeda (humedad del 100%) a 37°C durante 1 hora y luego durante toda la noche a 4°C.
- iii) El antígeno no unido se lava tres veces con PBS que contenga Tween 20 al 0,05% (PBS/Tween).

- iv) Se añaden 100 µl del suero problema y del control a una dilución predeterminada óptima en tampón bloqueador (PBS que contenga Tween 20 al 0,05%, y leche en polvo desnatada al 1%) a pocillos duplicados.
 - v) Se incuban las placas durante 30 minutos a 37°C.
 - vi) Se lavan las placas tres veces con PBS/Tween.
 - vii) Se diluye conjugado de anticuerpo anti IgG de camello generado en conejo a peroxidasa de rábano, o bien a peroxidasa de rábano/proteína A de *Staphylococcus aureus*, a una dilución de trabajo predeterminada en tampón bloqueador y se añaden 100 µl a los pocillos.
 - viii) Se incuban las placas a 37°C durante 30 minutos.
 - ix) Se lavan las placas tres veces con PBS/Tween.
- Se ha de hacer visible la reacción utilizando 100 µl de cromógeno 3,3' 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) por pocillo y se incuba 15 minutos a 37°C mientras se agita.
- xi) Se detiene la reacción 10 minutos más tarde con H₂SO₄ 2 M a un volumen de 50 µl/pocillo.
 - xii) Se miden los valores con un fotómetro a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados positivos son los valores superiores a la media +2 desviaciones estándar respecto a los sueros control negativos.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

C1. Vacuna viva atenuada

1. Antecedentes

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

Actualmente, se comercializan vacunas vivas atenuadas y vacunas inactivadas. La vacuna viva atenuada se preparó a partir de una cepa aislada de una cría de dromedario que presentaba viruela del camello generalizada (Wernery, 2000). La vacuna viva atenuada confiere una protección a largo plazo contra la viruela del camello (Wernery & Zachariah, 1999). Sin embargo, se recomienda una segunda dosis en animales de corta edad cuando tienen 8–12 meses, 2–3 meses después de la vacunación inicial, para evitar interferencias por parte de los anticuerpos maternos. Cuando se utiliza la vacuna inactivada, los animales deben vacunarse anualmente.

Las directrices para la producción de las vacunas veterinarias se indican en el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*.

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

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

Se obtienen muestras (como material costroso de la nariz, o lesiones o costras cutáneas) de una cría de camello que presente lesiones variolosas del camello generalizadas. Estas muestras se aplastan en MEM con antibióticos, se centrifugan, se someten a filtración estéril y se inoculan en células Vero confluentes y en la línea celular de piel de camello fetal (Dubca). Se observa un ECP tras 4 días de incubación a 37°C. Cuando el 80% de las células están infectadas, se recoge el cultivo celular, y se congela y se descongela. Este procedimiento se lleva a cabo tres veces seguido de sonicación a 80 Hz en hielo para liberar el virus. La suspensión se clarifica por centrifugación a 1.000 **g** durante 10 minutos. El sobrenadante se recoge y se confirma la identidad del virus de la viruela del camello empleando varios métodos de análisis. Tras el 10º pase en células Vero, se lleva a cabo una prueba en placa y se escoge la placa mayor para preparar la vacuna. El virus purificado en placa se pasa a continuación 110 veces por células Vero para atenuar el virus y se designa como virus del inóculo primario (MSV). El MSV se guarda liofilizado y se congela a –80°C.

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

Se realizan pruebas de pureza y de identidad del virus del inóculo y las células utilizadas para la producción de vacuna. El virus del inóculo debe estar libre de contaminación por virus extraños, bacterias, hongos y micoplasmas.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

Las células que se utilizan para la producción de la vacuna se preparan empleando un sistema de lotes de inóculo. El virus del inóculo se cultiva en células Vero. Cuando la monocapa es confluyente, las células se infectan con el virus vacunal. El cultivo celular se recoge cuando las células están al 100% infectadas por el virus de la viruela del camello. El sobrenadante se clarifica, se mezcla con un estabilizador, se introduce en viales y se liofiliza.

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

Debe demostrarse que los cultivos celulares y todos los productos de origen animal que se utilicen en la producción y mantenimiento de las células están libres de virus extraños, bacterias, hongos y micoplasmas.

2.2.3. Controles durante el proceso

Durante el cultivo del inóculo vírico de trabajo se comprueba el ECP. Las células control no inoculadas deben conservar su morfología hasta el momento de la recogida. La multiplicación del virus se pone de manifiesto titulando el sobrenadante recogido.

2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad/pureza

El procedimiento para las pruebas de esterilidad y de ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario se describe en el Capítulo 1.1.9.

ii) Safety

Cada lote de vacuna se prueba en diez camellos nunca antes expuestos, por la vía de administración recomendada y utilizando en cada animal una dosis 10 veces superior a la recomendada. Los animales se observan durante 7–14 días para comprobar si presentan reacciones adversas.

iii) Potencia del lote

La cantidad de virus presente en la vacuna viva atenuada se titula en cultivo celular y se calcula el título a punto final.

2.3. Requisitos para la autorización

2.3.1. Requisitos de seguridad

i) Seguridad en especies de destino y no de destino

La vacuna viva atenuada contra la viruela del camello no causa signos clínicos en camellos del Viejo Mundo susceptibles a esta enfermedad. Menos de un 1% de los animales presenta un aumento de temperatura corporal de como máximo 1°C.

ii) Reversión a la virulencia

No se conoce ningún caso de reversión a la virulencia en la vacuna viva atenuada.

iii) Precauciones

No debe tomarse ninguna precaución especial porque el virus de la viruela del camello es específico de hospedador.

2.3.2. Eficacia

La eficacia en animales susceptibles se comprueba en dromedarios nunca antes expuestos. Los animales de experimentación deben vacunarse dos veces con la vacuna viva atenuada, y 3 semanas después de la última dosis deben exponerse a una cepa natural virulenta del virus de la viruela del camello. La virulencia del virus de desafío debe comprobarse mediante la inoculación en animales control no vacunados. Los animales vacunados no deben presentar ningún signo clínico, mientras que los no vacunados deben presentar los signos clínicos característicos de la viruela del camello. También puede confirmarse la inmunidad a largo plazo que confiere la vacuna viva atenuada exponiendo a los animales vacunados 6 años después. La eficacia de la vacuna viva atenuada debe volver a evaluarse midiendo los niveles de anticuerpos contra el virus de la viruela del camello 21–30 días después de la vacunación, mediante ELISA y la prueba de neutralización del virus.

La vacuna viva atenuada puede proteger a los dromedarios frente a la infección durante al menos 6 años, y tal vez incluso de por vida.

2.3.3. Estabilidad

Las vacunas deben guardarse a 4–8°C, con la mínima exposición indispensable a la luz. El periodo de validez se determina titulando el virus.

C2. Vacuna inactivada

1. Antecedentes

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

Se dispone de una vacuna inactivada desde 1992, que se utiliza principalmente en el norte de África para prevenir la enfermedad (El Harrak & Loutfi, 1999). Esta vacuna se preparó a partir de una cepa aislada en un dromedario que presentaba una viruela del camello generalizada durante el brote que tuvo lugar en Marruecos en 1984 (El Harrak *et al.*, 1991). La vacuna inactivada confiere buena protección contra la viruela del camello tras dos inyecciones administradas con un intervalo de 3 a 6 meses, seguidas de un recordatorio anual. Esta vacuna se recomienda para animales de más de 8–12 meses, para evitar la interferencia de los anticuerpos maternos.

Las directrices para la producción de las vacunas veterinarias se indican en el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. A continuación se describe la producción de vacuna comercial inactivada contra la viruela del camello.

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

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

Se muestrean lesiones variolosas de un dromedario adulto que presente la viruela del camello generalizadas. Estas muestras se aplastan en MEM con antibióticos, se centrifugan, se someten a filtración estéril y se inoculan en la membrana corioalantoidea de huevos libres de patógenos específicos para el primer aislamiento (El Harrak *et al.*, 1991). Las lesiones variolosas obtenidas se pasan por células Vero confluentes de forma seriada siete veces. Se suele observar un ECP tras 3–4 días de incubación a 35°C. Cuando el 80% de las células están infectadas, se recoge el cultivo celular, y se congela y se descongela. Este procedimiento se lleva a cabo dos veces para liberar el virus. La suspensión se recoge y se comprueba la identidad del virus de la viruela del camello mediante varias pruebas. El virus en su octavo nivel de pases se designó como virus del inóculo primario (MSV) y se denominó cepa Laayoune T8. El MSV se mantiene congelado a –80°C.

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

Se realizan pruebas de pureza, identidad y título del virus inóculo, así como de la pureza de las células Vero que se utilicen para producir la vacuna. El virus inóculo debe estar libre de contaminación por virus extraños, bacterias, hongos y micoplasmas.

2.1.3. Validación como cepa vacunal

La cepa Laayoune T8 se validó como cepa vacunal tras tres pases sucesivos en células Vero empleando el método de la dilución limitante para purificar el virus. Las características del ECP y el título del virus son reproducibles y está demostrada la ausencia de agentes extraños.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

El virus inóculo se cultiva en células Vero. Las células utilizadas para producir la vacuna se preparan utilizando un sistema de lotes de inóculo. La infección por el virus inóculo tiene lugar en células Vero confluentes en frascos rotatorios o en biogenerador con micro-transportadores. La suspensión de virus se recoge cuando las células están infectadas al 80% por el virus de la viruela del camello. El virus se inactiva empleando beta-propiolactona y a continuación se mezcla con hidróxido de aluminio como adyuvante y se introduce en viales.

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

Debe demostrarse que el virus inóculo, los cultivos celulares y todos los ingredientes de origen animal que se utilicen en la producción están libres de virus extraños, bacterias, hongos y micoplasmas.

2.2.3. Controles durante el proceso

Durante el proceso de producción se realizan pruebas de la esterilidad y la pureza de las células. El virus recogido se somete a pruebas de esterilidad y se determina su título infeccioso, y el antígeno inactivado también se somete a pruebas de esterilidad y a pruebas que determinen si la inactivación ha sido completa.

2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad/pureza

El procedimiento para las pruebas de esterilidad y de ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario se describe en el Capítulo 1.1.9.

ii) Identidad

La identidad del virus vacunal podría confirmarse mediante PCR con el producto final inactivado.

iii) Seguridad

Cada lote de vacuna se prueba en dos camellos nunca antes expuestos, por la vía de administración recomendada y utilizando en cada animal una dosis 2 veces superior a la recomendada. Los animales se observan durante 14 días para comprobar si presentan reacciones adversas.

iv) Potencia del lote

La cantidad de virus presente en la vacuna inactivada se determina por titulación en cultivo celular antes de la inactivación y mediante PCR en tiempo real con el antígeno antes de añadir el adyuvante.

2.3. Requisitos de autorización/registro/licencia

2.3.1. Proceso de fabricación

La vacuna inactivada contra el virus de la viruela del camello se produce según las normas y procedimientos de buenas prácticas de fabricación (GMP) recomendados para las vacunas veterinarias inactivadas.

2.3.2. Requisitos de seguridad

i) Seguridad en especies de destino y no de destino

La vacuna inactivada contra el virus de la viruela del camello no causa signos clínicos ni eleva la temperatura corporal cuando se administra a animales susceptibles a la

enfermedad. Puede aparecer una reacción inflamatoria en el punto de inyección debida a la presencia del adyuvante, que no afecta a la salud del animal.

- ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas y aspectos medioambientales

No aplicable a las vacunas inactivadas.

- iii) Precauciones (peligros)

No debe tomarse ninguna precaución especial porque el virus de la viruela del camello es específico de hospedador.

2.3.3. Requisitos de eficacia

La eficacia se comprueba en seis crías de dromedario nunca antes expuestas, a las que se inyecta una cepa natural virulenta mediante dos inyecciones de la vacuna inactivada con un intervalo de 3 meses entre ellas. La cepa virulenta se titula en la piel del animal comparándola con cuatro animales control vacunados y dos animales control no vacunados. El título infeccioso obtenido en los animales vacunados debe ser como mínimo de 1,5 log DI_{50} menos que el título que se obtiene en los animales control. Además, los animales vacunados no deben presentar ningún signo de enfermedad generalizada. La eficacia de la vacuna inactivada también puede demostrarse por la aparición de anticuerpos tras la vacunación, que pueden determinarse mediante ELISA o la prueba de la neutralización del virus (El Harrak & Loutfi, 1999).

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

No existe ninguna vacuna contra la viruela del camello que permita una estrategia DIVA para controlar la enfermedad.

2.3.5. Duración de la inmunidad

La inmunidad a largo plazo generada por la vacuna inactivada también se ha confirmado exponiendo a los animales vacunados 1 año después de la vacunación inicial. La inmunidad conferida por la vacuna inactivada dura al menos 1 año tras la inyección doble, como se ha comprobado en dromedarios de corta edad nunca antes expuestos al virus. Tras múltiples vacunaciones, la inmunidad puede ser más duradera en dromedarios adultos; no se conoce ningún caso de fracaso de la vacunación en el campo con animales que no se vacunen periódicamente.

2.3.6. Estabilidad

Las vacunas deben guardarse a 4–8°C, con la mínima exposición indispensable a la luz. El periodo de validez es de 24 meses.

BIBLIOGRAFÍA

AZWAI S.M., CARTER S.D. & WOLDEHIWET Z. (1995). Monoclonal antibodies against camel (*Camelus dromedarius*) IgG, IgM and light chains. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **45**, 175–184.

AZWAI S.M., CARTER S.D., WOLDEHIWET Z. & WERNERY U. (1996). Serology of *Orthopoxvirus cameli* infection in dromedary camels: Analysis by ELISA and western blotting. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **19** (1), 65–78.

BALAMURUGAN V., BHANUPRAKASH V., HOSAMANI M., JAYAPPA K.D., VENKATESAN G., CAUHAN B. & SINGH R.K. (2009). A polymerase chain reaction strategy for the diagnosis of camelpox. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **21**, 231–237.

BERA B.C., SHANMUGASUNDARAM K., SANJAY BARUA, VENKATESAN G., NITIN VIRMANI, RIYESH T., GULATI B.R., BHANUPRAKASH V., VAID R.K., KAKKER N.K., MALIK P., MANISH BANSAL, GADVI S., SINGH R.V., YADAV V., SARDARILAL, NAGARAJAN G., BALAMURUGAN V., HOSAMANI M., PATHAK K.M.L. & SINGH R.K. (2011). Zoonotic cases of camelpox infection in India. *Vet. Microbiol.*, **152**, 29–38.

COETZER J.A.W. (2004). Poxviridae. *In: Infectious Diseases of Livestock*, Second Edition, Vol. 2, Coetzer J.A.W. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press Southern Africa, Cape Town, South Africa, 1265–1267.

- DAVIES F.G., MUNGAI J.N. & SHAW T. (1975). Characteristics of Kenyan camelpox virus. *J. Hyg.*, **75**, 381–385.
- EL HARRAK M. & LOUTFI C. (1999). Camel pox in the calf in Morocco. Identification of the virus. Vaccine Development and Application to Prophylaxis. Int. Workshop of Young Camel, Ouarzazate, Morocco, 24–26 October 1999. http://remvt.cirad.fr/CD/EMVT00_2.PDF
- EL HARRAK M., LOUTFI C. & BERTIN F. (1991). Isolation and identification of camel poxvirus in Morocco. *Ann. Rech. Vet.*, **22** (1), 95–98.
- JOHANN S. & CZERNY C.-P. (1993). A rapid antigen capture ELISA for the detection of orthopox viruses. *J. Vet. Med. [B]*, **40**, 569–581.
- KINNE J., COOPER J.E. & WERNERY U. (1998). Pathological studies on camelpox lesions of the respiratory system in the United Arab Emirates (UAE). *J. Comp. Pathol.*, **118**, 257–266.
- KRITZ B. (1982). A study of camelpox in Somalia. *J. Comp. Pathol.*, **92**, 1–8.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. & RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- MAYER A. & CZERNY C.-P. (1990). Chapter 4, Camelpox virus. *In: Virus Infections of Vertebrates, Vol. 3, Virus Infections of Ruminants*, Dinter Z. & Morein B., eds. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, The Netherlands, 19–22.
- MEYER H., PFEFFER M. & RZIHA H.-J. (1994). Sequence alterations within and downstream of the A-type inclusion protein genes allow differentiation of *Orthopoxvirus* species by polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.*, **75**, 1975–1981.
- MEYER H., ROPP S.L. & ESPOSITO J.J. (1997). Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate orthopoxviruses. *J. Virol. Methods*, **64**, 217–221.
- NOTHELFER H.B., WERNERY U. & CZERNY C.P. (1995). Camel pox: antigen detection within skin lesions – Immunohistochemistry as a simple method of etiological diagnosis. *J. Camel Pract. Res.*, **2** (2), 119–121.
- PFEFFER M., MEYER H., WERNERY U. & KAADEN O.-R. (1996). Comparison of camelpox viruses isolated in Dubai. *Vet. Microbiol.*, **49**, 135–146.
- PFEFFER M., NEUBAUER H., WERNERY U., KAADEN O.-R. & MEYER H. (1998a). Fatal form of camelpox virus infection. *Vet. J.*, **155**, 107–109.
- PFEFFER M., WERNERY U., KAADEN O.-R. & MEYER H. (1998b). Diagnostic procedures for poxvirus infections in camelids. *J. Camel Pract. Res.*, **5** (2), 189–195.
- ROPP S.L., JIN Q., KNIGHT J.C. MASSUNG R.F. & ESPOSITO J.J. (1995). PCR strategy for identification and differentiation of smallpox and other orthopoxviruses. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 2069–2076.
- TANTAWI H.H., SABAN M.S., REDA I.M. & EL-DAHABY H (1974). Camelpox virus in Egypt I – Isolation and Characterization. *Bull. Epizoot. Dis. Africa*, **22** (4), 315–319.
- WERNERY U. (2000). Production of an attenuated camelpox vaccine (Ducapox). *J. Camel Pract. Res.*, **7** (1), 117–119.
- WERNERY U. & KAADEN O.-R. (2002). Camel pox. *In: Infectious Diseases in Camelids, Second Edition*, Wernery U. & Kaaden O.-R., eds. Blackwell Science Berlin, Germany, 176–185.
- WERNERY U., KAADEN O.-R. & ALI M. (1997a). Orthopox virus infections in dromedary camels in United Arab Emirates (U.A.E.) during winter season. *J. Camel Pract. Res.*, **4** (1), 51–55.
- WERNERY U., MEYER H. & PFEFFER M. (1997b). Camel pox in the United Arab Emirates and its prevention. *J. Camel Pract. Res.*, **4** (2), 135–139.

WERNERY U. & ZACHARIAH R. (1999). Experimental camel pox infection in vaccinated and unvaccinated dromedaries. *J. Vet. Med. [B] Infect. Dis.*, **46** (2), 131–136.

YAGER J.A., SCOTT D.W. & WILCOCK B.P. (1991). Viral diseases of the skin. *In: Pathology of Domestic Animals*, Fourth Edition, Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N., eds. Academic Press, San Diego, California, USA, 629–644.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Viruela del camello (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 viruela del camello.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2008; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2014.