

UNIVERSIDAD NACIONAL  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

"DETERMINACION DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE LA MIXOMATOSIS  
EN CONEJOS DOMESTICOS DE COSTA RICA"

Trabajo Final de Graduación para optar por el título de  
Médico Veterinario en el grado académico de licenciatura.

Estudiante: Federico Chaverri Suárez.

881383-3

Tutor: DR. CARLOS JIMENEZ SANCHEZ  
Co-tutor: DR. JUAN ALBERTO MORALES ACUÑA  
Lectores: DRA. GABY DOLZ  
DR. LUIS VARGAS ARAUZ

9-1-100

### Agradecimientos

Al Dr. Carlos Jiménez quien como tutor siempre supo impulsarme para salir adelante con este trabajo.

Al Dr. Juan Alberto Morales por su valiosa colaboración que se extendió más allá del campo de la patología.

A la Dra. Gaby Dolz por el especial interés demostrado por esta investigación.

Al Dr. Luis Vargas por su inquebrantable voluntad de colaboración.

Quisiera agradecer también al Dr. Eugenio Sancho, cuyo espíritu de servicio se mantuvo vigente a todo lo largo de este trabajo.

Agradezco así mismo a la Escuela de Medicina Veterinaria por su fundamental contribución con equipo material y humano en la realización de la parte de laboratorio de este estudio.

Por último quiero también dejar patente mi agradecimiento a todas aquellas personas que con el aporte de diversos elementos hicieron posible la realización de esta investigación.

Indice

Resumen	4
Introducción	6
Revisión bibliográfica sobre la mixomatosis	12
Generalidades sobre la mixomatosis	12
La mixomatosis en Costa Rica	48
Material y Métodos	52
Resultados	59
Discusión	87
Conclusiones	95
Recomendaciones	97
Anexo	100
Referencias bibliográficas	102

### Resumen

Se hizo un estudio retrospectivo en los archivos del Laboratorio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional abarcando el período de 1976 a 1992, en el cual demostró evidencia histopatológica de la existencia de la mixomatosis en Costa Rica desde 1977; sin embargo, en una amplia revisión bibliográfica realizada no se encontraron publicaciones científicas realizadas en el país sobre esta enfermedad.

Para la ejecución de esta investigación se hizo además un estudio prospectivo utilizando 5 conejos sospechosos de sufrir mixomatosis. Estos animales fueron sometidos a un estudio anatómico e histopatológico, además, a partir de sus tejidos, se intentó el aislamiento viral en cultivos celulares. También se estudiaron histopatológicamente los tejidos conservados de los casos diagnosticados como mixomatosis encontrados en el estudio retrospectivo.

Las alteraciones histopatológicas encontradas en los casos de archivo son muy similares a las que presentaron los 5 casos del estudio prospectivo y tanto las lesiones macro como las microscópicas halladas, coinciden ampliamente con las que la literatura cita para la mixomatosis.

De los 5 casos del estudio prospectivo en 4 se intentó el aislamiento viral, de éstos, 3 presentaron un efecto citopático en los cultivos celulares.

En el sobrenadante de estos cultivos se logró determinar y fotografiar por microscopía electrónica de transmisión el Virus de la Mixomatosis.

Los hallazgos de la presente investigación permitieron, a su vez, establecer por primera vez en el país el diagnóstico etiológico de esta enfermedad.

### Introducción

El conejo doméstico se deriva del conejo silvestre europeo y ambos taxonómicamente se consideran una sola especie: **Oryctolagus cuniculus** (2,5,9,22,25,28,29,31,45). El lugar de origen de esta especie es la cuenca mediterránea (14,25).

La domesticación del conejo data de la Edad Media y en esa época era practicada principalmente en los monasterios franceses (25), sin embargo, es en los últimos 100 años que se han mejorado sustancialmente las características productivas de la especie (41).

El conejo es uno de los animales domésticos más versátiles pues sirve al hombre de diversas maneras. Su crianza presenta una serie de ventajas sobre las otras especies domésticas, así por ejemplo: requiere de una inversión moderada (14,17,44), puede realizarse en espacios pequeños, incluso urbanos, por el tamaño del animal y el hecho de que no produce ruido (40,44), su reproducción es sumamente eficiente en cuanto a precocidad, periodicidad y número de crías (40), el ciclo de producción es muy corto (14) y el manejo puede realizarse con un ligero esfuerzo pudiendo utilizarse entonces mano de obra no apta para trabajos pesados (14,17). Es por eso común observar explotaciones domésticas manejadas por amas de casa que aprovechan los residuos de cocina o de agricultura como alimento para los animales, obteniéndose una fuente de ingresos y de carne para el consumo familiar. Las explotaciones industriales muchas veces se originan en las domésticas y tienen un manejo

intensivo de los animales utilizando concentrados para la alimentación, obteniendo así altos rendimientos (1,14).

El nivel de producción de carne de conejo varía en los diferentes países y es quizá la forma más importante en que esta especie es aprovechada por el hombre. En condiciones óptimas un conejo sólo tarda de 95 a 98 días desde la cubrición de su madre para obtener un peso adecuado y ser sacrificado para consumo (44); además es una de las fuentes de proteína animal más económica de producir, siendo sólo superada por la leche, los huevos, el pollo y la carne de caballo en ese orden (1). El valor nutritivo de la carne de conejo es muy alto, superando incluso al de las aves (17). Ilustrando la utilidad del conejo como productor de carne, Sandford (1988), cita investigaciones que indican que en conejos "se puede conseguir medio kilogramo de peso en canal con 1,2 kilos de concentrado y medio kilo de forraje" y que el conejo puede producir más carne por unidad de terreno que cualquier otro animal. La carencia de carne ocasionada por la Primera y la Segunda Guerras Mundiales estimuló la producción de conejos con fuentes de alimentación baratas en espacios reducidos, obteniéndose una rápida producción de carne de alta calidad, así la cunicultura se constituye como una opción viable para resolver los problemas alimenticios en períodos de crisis (34,44).

Otro aspecto importante en la producción de conejos es el aprovechamiento de su piel incluso en razas de carne. El uso de la piel de conejo en la peletería está ampliamente difundido y en la actualidad cobra especial importancia al ser una alternativa muy

utilizada en sustitución de otras pieles más costosas de animales en peligro de extinción. La piel de conejo se aprovecha en forma total ya que las partes consideradas de menos valor se emplean en la fabricación de fieltros, pegamentos y gelatinas (17,44).

Existen razas especializadas en la producción de pelo, el cual es procesado por la industria textil para la fabricación de prendas de vestir (17,44).

El conejo también brinda un gran aporte a la humanidad a través de su uso como animal de laboratorio de fácil manejo y de gran valor para estudios biológicos y fabricación de antisueros (17,44).

Desde el punto de vista recreativo el conejo también sirve al hombre como animal de caza (25) y como fuente de distracción, ya que para muchas personas la crianza de animales constituye una forma de esparcimiento y el conejo por sus características permite este entretenimiento de forma poco problemática y muy práctica, en condiciones en que con otros animales domésticos no sería posible, es así como ha sido utilizado en programas para niños, jóvenes y personas de la tercera edad (44).

Por último no son pocas las familias en las que los conejos constituyen un animal de compañía, principalmente para niños, pues responden muy bien a un trato amable comportándose como verdaderas mascotas (41,44).

La mixomatosis es la enfermedad viral de los conejos de más importancia económica (25), por eso existen normativas a nivel nacional e internacional tendientes a impedir su difusión



(16,32,33,37,38). La situación de la mixomatosis en Costa Rica se discutirá más adelante, pero de acuerdo a la información que hemos obtenido a través de una extensa revisión bibliográfica y de comunicaciones personales en el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), en Costa Rica no se han publicado estudios científicos relacionados con la enfermedad. Sólo encontramos referencias previas orientadas al diagnóstico histopatológico de la misma, las cuales se encuentran en el archivo del Laboratorio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional y en las que están los resultados de necropsia de algunos conejos clínicamente sospechosos de sufrir mixomatosis, procesados como parte del servicio de diagnóstico de ese laboratorio.

Es debido a este vacío en las investigaciones sobre la mixomatosis en nuestro país, además de la importancia que los conejos tienen para el hombre y por el interés particular que sobre esta especie y esta enfermedad tenemos, que nace la idea de realizar este estudio, el cual parte de la hipótesis de que la mixomatosis es una enfermedad que se encuentra en Costa Rica y que puede ser demostrada a partir de animales enfermos por medio de métodos de laboratorio como son: el cultivo y aislamiento viral, la histopatología de las lesiones y la microscopía electrónica del aislamiento del virus.

El objetivo general de esta investigación es confirmar la existencia de la mixomatosis en conejos domésticos de Costa Rica mediante la aplicación de los métodos de diagnóstico de laboratorio mencionados y comunicarlo con la finalidad de que se tomen las

medidas adecuadas para el control de la enfermedad en el país. Para este fin hemos de cumplir con los siguientes objetivos específicos:

- 1) Demostrar en Costa Rica la presencia del virus causante de la mixomatosis mediante su aislamiento a partir del estudio prospectivo de conejos clínicamente sospechosos de sufrir la enfermedad.
- 2) Replicar el virus en una línea celular de endotelio fetal de conejo, para observar los efectos que sobre las células se producen y compararlos con los que la literatura menciona para la enfermedad.
- 3) Observar, identificar y fotografiar el virus por microscopía electrónica de transmisión, a partir del sobrenadante de los cultivos celulares inoculados en que se produzca efecto citopático.
- 4) Realizar la necropsia de los animales sospechosos y comparar las lesiones macroscópicas encontradas con las que se describen en la literatura para la mixomatosis.
- 5) Hacer histopatología de los tejidos que macroscópicamente se observen más afectados, para determinar las características de las lesiones existentes y confrontarlas con las que describe la literatura para la mixomatosis.

6) Efectuar un estudio retrospectivo en los archivos del Laboratorio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, con el fin de determinar si existen casos sospechosos de mixomatosis a la necropsia que hayan sido estudiados por ese laboratorio antes de la realización de ésta investigación.

7) Retomar el estudio histopatológico de los casos encontrados en estos archivos a través de una nueva valoración de los tejidos conservados en láminas o en bloques de parafina, con el fin de compararlos con los casos objeto del estudio prospectivo y establecer las relaciones pertinentes.

8) Presentar al Ministerio de Agricultura y Ganadería los resultados de este estudio, para que en caso de demostrarse la existencia del Virus de la Mixomatosis en el país, esta investigación le sirva a esa institución como respaldo para considerar a esta enfermedad como enzoótica en Costa Rica.

9) Hacer una revisión bibliográfica sobre la mixomatosis de la forma más completa posible con el fin de efectuar la investigación con los mejores elementos de juicio y para que sirva de fuente de consulta sobre la enfermedad a quien tenga interés en la misma.

10) Enunciar recomendaciones a los cunicultores y propietarios de conejos domésticos en general sobre las medidas de prevención y control para la mixomatosis encontradas en la literatura.

Revisión Bibliográfica sobre la Mixomatosis

## 1) Generalidades sobre la Mixomatosis:

## 1.1) Definición:

Es una enfermedad infectocontagiosa de los lepóridos ocasionada por un leporipoxvirus. Su comportamiento es epizootico y de carácter inflamatorio y neoformativo (5,28).

## 1.2) Sinonimia:

Mixomatosis infecciosa de los conejos, Cabeza grande, Enfermedad de los mosquitos, Mixoma infeccioso de Sanarelli (5,28).

## 1.3) Historia:

La enfermedad fue descrita por primera vez por Sanarelli en 1898 en Montevideo, Uruguay en conejos domésticos de su laboratorio (28), siendo históricamente el segundo virus patógeno animal reconocido (45). Luego fue determinada por Splendore en Brasil en 1909, en Argentina por Rosenbusch en 1919 y en 1928 Kesel la estudia en California (28). En 1939 se introdujo a Australia para combatir la plaga de conejos que se había extendido por ese país a partir de los conejos domésticos llevados por los europeos en 1859 (2,28).

En 1952 fue introducida a Francia por un particular para eliminar conejos que causaban daños en su propiedad, a partir de este hecho la enfermedad cobró más importancia, ya que en tres años se diseminó por toda Europa con una gran repercusión biológica y económica. Este brote fue provocado por el virus estándar suramericano (2,25).

#### 1.4) Distribución:

La enfermedad se ha observado en Suramérica, Estados Unidos, Europa y Australia (5,28,45); aunque otros autores sostienen que la distribución es mundial (33).

#### 1.5) Etiología:

El agente causal es un virus de la familia Poxviridae, del género Leporipoxvirus y especie: Virus de la Mixomatosis del Conejo (31). Los poxvirus son los virus más grandes que se conocen (12), en el virus de la mixomatosis la longitud del virión maduro es de 290 a 300nm (9,52) por 250nm de ancho por 110nm de grosor (52), posee una forma ovoidea y es envuelto (9). Esta envoltura está formada por complejas estructuras tubulares que generalmente están dispuestas al azar, aunque algunas veces se encuentran ordenadas en forma de espiral (29), estas estructuras son de naturaleza lipoproteica (9). Frecuentemente se observa en el virión una membrana de cubierta derivada de la membrana celular de la célula

huésped, sin embargo esta membrana no es indispensable para la infectividad del virus (12). Las partículas virales inmaduras son más bien esféricas y en ellas en vez de observarse una envoltura bien definida se aprecian áreas de condensación interna (9).

El genoma está compuesto por una molécula de ADN relativamente grande cuyo peso molecular es de alrededor de 160 a 200 X 10<sup>6</sup> Daltons, esta molécula está constituida por una doble hebra y es lineal (12). El ADN se encuentra dentro de un core o cuerpo interno central bicóncavo (9).

En los poxvirus se encuentran unas 30 proteínas estructurales (11) y varias enzimas incluyendo la transcriptasa (12). La replicación viral se da en el citoplasma celular (11,12).

El virus es bastante resistente al frío y a la desecación manteniéndose en pieles secas de conejo hasta por 5 meses (28), sin embargo Kötsche y Gottschalk (1974) citan que la capacidad multiplicativa del virus se conserva en el animal hasta 300 días postmortem en su piel y pelo.

En glicerina a 4° C se conserva su virulencia hasta 3 años (28) y es inactivado a 55° C en 25 minutos (45), aunque Merchant y Packer (1975) sostienen que a esta temperatura la inactivación se da en 10 minutos y que a 50° C se logra en una hora.

El virus de la mixomatosis es resistente a la mayoría de los desinfectantes, siendo la formalina el de elección ya sea en solución de 1 a 3% o en forma gaseosa (25); es además sensible al éter (29,31,45) y a pH menores a 4,6 (31).

Actualmente se considera que existen dos grupos principales de cepas del virus de la mixomatosis: las cepas Californianas y las Suramericanas (52).

#### 1.6) Epizootiología:

La mayoría de los autores coinciden en que la enfermedad afecta solo a los lepóridos (9,22,29,39,45), sin embargo Sanarelli logró infectar perros, los cuales sufrieron una forma cutánea y otra nerviosa de la enfermedad, con parálisis y muerte en 6 meses (28). Capanini, citado por Mascaro (1975), menciona que en humanos la infección ha tenido un curso benigno; profundizando sobre este aspecto Kötsche y Gottschalk (1974) sostienen que: "Existen referencias muy escasas de contagio a hombres que manipularon conejos con mixomatosis; las personas presentaban en tal caso una conjuntivitis supurada y edema de los párpados, pero el curso de la enfermedad era leve".

En los lepóridos se considera que es la enfermedad viral de más importancia económica (25) y ataca principalmente a la especie *Oryctolagus cuniculus*, que comprende a los conejos europeos y a todas las especies de conejos domésticos ya que se derivan de éstos (2,4,9,22,25,28,29,31,45).

Las liebres (*Lepus* spp) son raramente afectadas (2,12,22,25), ocurriendo esto en brotes intensos en poblaciones cunícolas, además la transmisión de la enfermedad de una a otra liebre no parece posible (12,25).

El conejo americano o conejo cola de algodón (*Sylvilagus* spp) no se ve afectado por la enfermedad, constituyéndose en un peligroso portador sano y reservorio de la misma (4,9,26,31).

Algunos autores mencionan explícitamente a algunas especies del género *Sylvilagus* como resistentes a la enfermedad, tales como el conejo silvestre de Brasil (*Sylvilagus braziliani*), el conejo silvestre de California (*Sylvilagus bachmani*) (20,22) y el *Sylvilagus minensis* (5). El virus existe en forma natural en los conejos del género *Sylvilagus* en algunas regiones de América (9,22) y produce en éstos una enfermedad enzoótica no fatal caracterizada por tumefacciones cutáneas sin lesiones sistémicas (22,52). De acuerdo a lo anterior es de suponer que el agente etiológico es originario de América y que los conejos domésticos al ser susceptibles y entrar en contacto con el virus desarrollaran la enfermedad tal y como se conoce.

Debido a que en Europa y Australia la mixomatosis fue introducida artificialmente durante el presente siglo, su evolución ha podido ser estudiada muy de cerca y su comportamiento en esos países es el más utilizado en la literatura para describir los aspectos epizootiológicos de la enfermedad.

Cuando la enfermedad entra a poblaciones libres de la misma se produce un brote con una alta morbilidad y mortalidad, pudiendo llegar esta última a un 99 a 99,5% (22,25,45), sin embargo, a lo largo del tiempo el curso de la enfermedad se va tornando más leve en ambos aspectos, lo cual puede deberse a varias razones: a) Aparecimiento de cepas con menor virulencia. b) Desarrollo de



algún grado de resistencia genética a la enfermedad en la población (19,22,25), cuya heredabilidad se ha estimado en 0,3 (19). c) Aumento del número de animales inmunes en la población debido al gradual incremento de los sobrevivientes a la enfermedad (25). En Europa la mixomatosis aun presenta un índice de mortalidad de entre un 40 a un 70% (2).

Hoy día la mixomatosis es considerada una enfermedad epizootica y tanto en Europa y Australia como en Suramérica se habla de que se presenta en epizootias periódicas muy relacionadas a las épocas del año en las que aumenta la población de los vectores de la enfermedad, teniendo por la tanto un comportamiento estacional (2,5,9,25,45). En California las epizootias aparecen cada 8 a 10 años (27,31). En los conejos del género *Sylvilagus* en Centro y Sur América, así como en California la enfermedad es natural (20) y se considera enzoótica (22).

La transmisión puede producirse por contacto directo (2,12,25,26,28,29), por vía aerógena (2,26), a través de secreciones (29) y por medio de jaulas, comederos u otros objetos contaminados (26). Sin embargo, la vía de transmisión más importante es a través de artrópodos hematófagos, los cuales actúan como vectores mecánicos del virus (22,24,25,28); y son los responsables de transportar el virus desde los reservorios hasta el conejo doméstico o bien de poblaciones enfermas a poblaciones sanas con gran rapidez (26).

Existe una gran diversidad de artrópodos capaces de transmitir la enfermedad, incluyendo mosquitos, moscas hematófagas y pulgas

(2,5,7,9,12,21,22,24,25,26,28,29,39,45), además, se citan como transmisores a los piojos chupadores, ácaros y garrapatas (20,25,52); lo cual corresponde con lo que sostienen Fenner et al. (1974), en el sentido de que no existe una alta especificidad de los vectores para aquellos virus que son transmitidos mecánicamente como es el caso de la familia Poxviridae; quizás por lo anterior se han mencionado también algunas aves como transmisoras del virus (25) e incluso hasta plantas con espinas como los cardos australianos *Cirsium vulgare* y *Arthamus lanatus*.

A continuación se enumeran los artrópodos transmisores de la mixomatosis que se citan por su nombre científico en la literatura consultada:

Pulgas:

*Spilopsyllus cuniculi* (2,20,21,25,45)

*Echidnophaga myrmecobii* (32,52)

Mosquitos:

*Anopheles* spp (20)

*Aedes* spp (20)

*Anopheles annulipes* (20,52)

*Aedes cespius* (52)

*Aedes scapularis* (53)

*Aedes detritus* (52)

*Aedes aegypti* (53)  
*Aedes maculipennis* (52)  
*Aedes freeborni* (52)  
*Culex annulirostris* (20,52)  
*Culex modestus* (52)  
*Culex pipiens australicus* (52)

Simúlidos o moscas negras:

*Simulium bezzii* (24)  
*Simulium melatium* (24,52)  
*Simulium ornatum* (24)  
*Austrosimulium pestilens* (24)  
*Austrosimulium furiosum* (24,52)

Piojos:

*Haemodipsus ventricosus* (52)

Acaros:

*Cheyletiella parasitivorax* (52)  
*Listrophorus gibbus* (52)

El vector adquiere el virus cuando al alimentarse penetra la piel y el tejido subcutáneo de las áreas inflamadas que contienen altos títulos del virus, éste queda entonces en el aparato bucal del artrópodo, el cual al alimentarse de un conejo susceptible lo inocula en la piel o en el tejido subcutáneo del mismo (12,20,52). Se sabe que la cantidad de virus obtenida por un vector al picar a un conejo mixomatoso es de 10 a 2000 veces la  $DL_{50}$  del virus para un animal susceptible, se ha estimado que de esta cantidad un 12% es inoculado por el vector al alimentarse en un conejo susceptible (52). En la piel el título mínimo necesario para que se de la transmisión es de  $10^7$  dosis infectante (13). Es importante destacar que el virus no es adquirido por el vector a partir de la sangre virémica del hospedero, sino que lo obtiene de la piel y tejido subcutáneo (12,52).

Se ha demostrado que el virus sobrevive en pulgas sin alimentación hasta 105 días en madrigueras artificiales (20). Por otro lado, Aragao, citado por Zeledón y Jirón (1978), demostró que el *Aedes scapularis* y el *Aedes aegypti* pueden transmitir el virus hasta 17 días después de alimentarse de un animal infectado. Kötsche y Gottschalk van más allá y aseguran que en las garrapatas, los ácaros, las pulgas y los dípteros de los géneros *Anopheles* y *Simulium* el virus de la mixomatosis conserva su virulencia hasta 6 meses. Sin embargo, Day et al. (1956), citados por Yuill (1981) afirman que la cantidad de virus infectante disminuye aproximadamente un 20% cada día.

Para explicar el reaparecimiento de la mixomatosis después de muchos años de su ausencia en poblaciones de conejos aisladas, Williams et al. (1972), citados por Yuill (1981), han sugerido que el virus permanece latente en los conejos. Por otra parte Lebas et al. (1986) afirman que los animales que sobreviven a la enfermedad se convierten en portadores sanos del virus.

#### 1.7) Patogenia:

El virus pox de los ratones ha sido utilizado como modelo para describir la patogenia de diversas infecciones virales exantémicas y se ha demostrado que la mixomatosis tiene esencialmente la misma patogénesis que este virus (12); la cual consiste en una multiplicación inicial del virus en el punto de entrada en la piel que generalmente es la base de la oreja o la periferia de la órbita ocular (2,12). Posteriormente el virus llega al linfonodo regional donde se multiplica, todo esto sucede durante el primer día de infección. Ya para el segundo día el virus pasa a la sangre, produciéndose una viremia primaria. Durante el tercer día el virus se multiplica en el hígado y bazo. Los títulos del virus en la sangre se incrementan de nuevo el día cuarto, produciéndose entonces una viremia secundaria; luego entre el quinto y sexto día el virus vuelve a la piel, donde produce una infección local y se multiplica; de manera que ya para el séptimo día se encuentran lesiones primarias en la piel (12). Estas lesiones se conocen como

mixoma primario y producen una reacción inflamatoria con edema en la cabeza (2).

Se considera que la viremia que se produce al final del período de incubación y la consecuente formación de complejos inmunes circulantes es la responsable de la fiebre que es uno de los primeros síntomas (12).

Según Duclos et al. (1983), las reacciones locales que se producen como resultado de la enfermedad se dividen en dos grupos:

a) Reacción celular: se caracteriza por la hipertrofia y deformación de las células, las cuales muestran inclusiones citoplasmáticas y finalmente sufren lisis. Este efecto citopático es el mismo que se observa en cultivos de células infectadas.

b) Reacción tisular: se diferencian dos tipos:

i) Reacciones epiteliales: caracterizadas por la hiperplasia y destrucción simultánea del epitelio a causa de la replicación viral.

ii) Reacciones conjuntivas: son dominadas por el edema, que viene a causar disociación y consecuentemente destrucción de las fibras colágenas y elásticas.

En algunos casos el virus puede llegar al pulmón ocasionando una reacción edematosa generalizada asociada a un enfisema de compensación. Si la evolución se prolonga por más de 15 días, se produce generalmente una infección bacteriana secundaria que puede ser causada por *Pasteurella* spp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Proteus* spp, *Bacillus* spp o *Bordetella* spp, presentándose una bronconeumonía. Como vías de entrada del virus

al pulmón se mencionan la forma aerógena y la sanguínea cuando se produce la viremia (8).

Hay ciertos factores especiales que afectan la patogénesis de la enfermedad. Uno de ellos es la preñez, pues aparentemente las lesiones cutáneas en hembras preñadas son menos severas, sin embargo, las lesiones de pulmón e hígado son mayores en las mismas comparadas con conejas no grávidas (28). Otro de estos factores es la parasitosis con el helminto *Graphidium strigosum*, que se ha demostrado que aumenta la susceptibilidad a la enfermedad (13).

Por otro lado, Marschall (1959), citado por Fenner et al. (1974), encontró que una cepa atenuada del virus incrementó considerablemente su virulencia si la temperatura ambiental es baja en el sitio donde se encuentran los animales.

#### 1.8) Inmunidad:

Debido a que la mixomatosis en sus inicios causaba una mortalidad cercana al 100%, la inmunidad de los animales pudo ser estudiada a partir de la aparición de formas menos severas de la enfermedad.

Se ha determinado que los animales que sobreviven a la enfermedad quedan inmunes de por vida (21,29), aunque hay referencias en la literatura que mencionan que los anticuerpos se mantienen solamente hasta los 18 meses después de la enfermedad. Bruguere (1992) sostiene que en la forma atenuada de la enfermedad se presenta un cuadro clínico que dura de 1 a 4 semanas, después

del cual se instaura una inmunidad que disminuye la presentación de casos clínicos durante 2 a 3 meses, sin embargo, según afirma, esta inmunidad es muy precaria y se rompe fácilmente, presentándose de nuevo la enfermedad:

El antígeno viral estimula la producción de anticuerpos neutralizantes, precipitantes y fijadores de complemento (45).

Existen diferentes posiciones en cuanto a la inmunidad pasiva que reciben las crías de madres inmunes. Mientras algunos autores sostienen que los gazapos nacen con algún grado de protección (45), otros indican que la enfermedad se produce en éstos antes de llegar a las 8 semanas de edad (2,45). Los anticuerpos maternos que están en la circulación del neonato son adquiridos antes de nacer (12).

Antes de la aparición de los anticuerpos neutralizantes, durante la viremia, se produce una reacción mediada por el complemento y a la vez se registra un aumento de los monocitos y los linfocitos circulantes (12).

La aparición de anticuerpos neutralizantes se produce después del período de incubación (12), unos 8-10 días después del contacto con el virus (2) y pueden ser detectados mediante neutralización, fijación de complemento o precipitación en agar-gel (25).

A nivel local es importante la acción de los macrófagos contra el virus y se ha demostrado que la actividad de éstos es más eficiente en animales inmunes que en otros animales, esto es atribuido a la presencia de anticuerpos que aumentan la efectividad de los macrófagos activados (12).



Los aspectos inmunitarios relacionados con la vacunación serán analizados más adelante.

### 1.9) Sintomatología:

Existen varias formas clínicas de la enfermedad (2), cuya presentación dependerá de la resistencia de la población, de la virulencia de la cepa y de las características de la epizootia misma (2,12,25).

#### 1.9.1) Clásica, nodular o mixomatosa:

El período de incubación oscila entre 3 y 10 días (2,25). La enfermedad puede seguir varios cursos:

1.9.1.1) Curso agudo: Entre los primeros síntomas están la fiebre (12), que varía de 40° a 41° C (49) pudiendo llegar hasta los 42°C (27) y la formación de un mixoma primario; posteriormente se produce una blefaroconjuntivitis aguda que al inicio es serosa y luego se torna purulenta (2,25,45). En este período se observa fotosensibilidad en el animal y se inicia el edema en la cabeza, principalmente en los labios, hocico, párpados y base de las orejas, adquiriendo el animal un aspecto leonino (2,7,25).

Debido a la inflamación y exudado purulento en 1 o 2 días los conejos no pueden abrir los ojos y por lo tanto se les dificulta el

acceso al agua y alimento (2,45); simultáneamente se presenta una rinitis purulenta que dificulta la respiración y ocasiona que el animal emita ruidos respiratorios (25).

En 2-3 días se encuentran inflamaciones similares en el ano y la genitalia (2,25,45), que pueden llegar a ser purulentas (45). La mayoría de los autores coinciden en que la inflamación se circunscribe a la genitalia externa incluyendo el escroto, sin embargo algunos sostienen que se presenta también orquitis (21), no obstante, también se afirma que la tumefacción en la región testicular que se puede presentar es producida por alteraciones del escroto y no del propio testículo (45).

A los 3-5 días de iniciados los síntomas se presentan mixomas secundarios por toda la superficie corporal, estos mixomas son engrosamientos noduliformes y consistentes de la piel y se encuentran sobre todo en la base de la oreja (2,25,45), pabellón auricular, porción distal de las extremidades y piel de la región lumbar (25); estos nódulos son fríos, de consistencia elástica, indoloros y aislados o confluentes (2).

Los mixomas adquieren una coloración rosada al inicio, que luego se torna roja, violeta y finalmente negruzca (2).

En este punto es necesario aclarar que la lesión a la que nos hemos referido antes con el nombre de mixoma recibe diferentes denominaciones por los diversos autores, entre ellas tenemos: tumefacción (21), nódulo (7,22,25,39,49), mixoma (2,5,8,9) y tumor (12,20,26,28,29,31,45). Fenner et al. (1974) consideran la lesión como tumoral ya que, según afirman, lo que se produce es un fibroma

debido a la extensa proliferación de fibroblastos en la dermis. Por otro lado, el nombre de mixoma que se le da a la lesión obedece a su aspecto mucosoide (5); no obstante Bruguere (1992), considera que "la denominación de mixoma es impropia para esta tumefacción inflamatoria que no es de origen oncogénico".

En el curso agudo la muerte sobreviene entre el día 8 y 10 de iniciados los síntomas y se produce por inanición ya que el animal es incapaz de alimentarse (2,25), también puede deberse a la obstrucción de las vías respiratorias por los mixomas mismos o bien por infecciones bacterianas secundarias (2). En la pequeña porción de animales que sobreviven pueden quedar nódulos fibróticos alrededor de ojos, nariz, boca y genitalia (39), aunque otros autores afirman que se produce regresión de los tumores (31).

En el caso del conejo silvestre europeo el animal sale a morir fuera de la madriguera a diferencia de lo que sucede con otras enfermedades (25).

**1.9.1.2) Curso sobreagudo:** La duración del cuadro es menor y por eso no se llegan a presentar la totalidad de los síntomas descritos para el curso agudo. La presentación de casos sobreagudos está relacionada a epizootias y se acompaña también de casos típicos de la enfermedad que facilitan su diagnóstico clínico (25).

**1.9.1.3) Curso subagudo:** La sintomatología es similar a la observada en el cuadro agudo pero de menor severidad, de ahí que la

enfermedad se prolongue y la muerte se produzca entre el día 20 y 30 después de la presentación de los primeros síntomas (2).

1.9.1.4) **Curso crónico:** Se presenta hacia el final de la epizootia como resultado de la pérdida de la virulencia del virus y del aumento de la resistencia de los conejos (2,12,25). Se produce una disminución de los índices de morbilidad y mortalidad y el cuadro clínico se hace más lento y se modifica, de manera que no se presenta el edema característico y los mixomas se encuentran muy delimitados en la punta de la nariz, párpados o base de la oreja (2,25). Estos mixomas producen un exudado que se seca rápidamente produciendo costras, las cuales se desprenden alrededor del día 15, originando una cicatriz depilada que perdura por algunas semanas. Las costras se pueden irritar produciéndose úlceras o bien pueden contaminarse con bacterias, principalmente con *Staphylococcus* spp y *Streptococcus* spp (2).

Kötsche y Gottschalk (1974) indican que los mixomas delimitados se extienden posteriormente a amplias zonas del cuerpo, principalmente a orejas y extremidades y que por último sufren escarificación.

La presentación de alteraciones en las gónadas es común en ambos sexos y puede disminuir la fecundidad en un 10-30% (2), pudiendo llegar a presentarse en los machos una esterilidad temporal (52).

En opinión de algunos autores esta forma crónica no es letal, aunque otros sostienen que parte de los animales muere (2).

### **1.9.2) Forma amixomatosa o respiratoria:**

El período de incubación es de 1 a 3 semanas. Aunque Lebas et al. (1986) afirman que en esta forma de la enfermedad solamente se observan síntomas respiratorios, Bruguere (1992) se refiere al cuadro de forma más amplia:

La sintomatología prevalente es la ocular con tumefacción y lagrimeo, además la genital, pero sobre todo la nasal con exudado mucopurulento. En contraste con la forma clásica, las lesiones cutáneas (mixomas) no se presentan o son escasas y además son comunes las lesiones articulares con edema y zonas congestivas y hemorrágicas.

Dependiendo de la virulencia de la cepa el curso de la forma respiratoria puede ser: agudo, que es mortal, subagudo o crónico; en estos dos últimos casos el animal puede salvarse con terapia que evite las infecciones bacterianas secundarias, causadas por los agentes mencionados en el punto 1.7.

### **1.9.3) Forma atenuada:**

Se caracteriza por un aumento en la frecuencia de abortos y en la de esterilidad y generalmente aparece después de la introducción a la conejera de un reproductor infectado en forma inaparente. La mayoría de las hembras preñadas abortan y las que llegan al parto abandonan las crías rápidamente. Los gazapos presentan blefaritis.

También algunas hembras al ser presentadas al macho lo rechazan. Todo el cuadro dura de 1 a 4 semanas, luego disminuye la morbilidad por efecto de la inmunidad que se establece, pero a los 2 a 3 meses como máximo se vuelven a presentar casos clínicos tanto en las madres como en sus crías (2).

#### **1.9.4) Forma cutánea:**

Es más corriente en el conejo de angora y se presenta sobre todo en aquellos establecimientos en donde se depilan los animales (2), práctica común en las conejeras lanares de Europa. Los mixomas aparecen en el dorso sin que hayan lesiones en la cabeza o en la genitalia. La lesión se observa sobre la piel depilada de 7 a 10 días después de realizado el corte del pelaje y es de un aspecto rosáceo que luego de un día se torna negruzco, razón por la cual esta forma ha sido llamada también "Enfermedad del botón de rosa o botón negro" (2).

#### **1.10.) Patología:**

##### **1.10.1) Lesiones macroscópicas:**

Se encuentran numerosas masas elevadas de forma redonda u ovoide (22) distribuidas por todo el cuerpo, pero principalmente en la cabeza, región ano-genital, dorso y porción inferior de las extremidades (25). La consistencia de estas tumefacciones es

edematosa en la genitalia y sólida en el resto del cuerpo (22), aunque algunos autores la describen como gelatinosa (28,45). Dos Santos (1982) sostiene que este aspecto gelatinoso del nódulo obedece a la degeneración mucosa de sus elementos conjuntivos.

Los mixomas se encuentran circunscritos a la piel y tejido subcutáneo (25), aunque algunas veces están unidos a la musculatura que existe bajo estas capas (22). Cuando los nódulos son recientes presentan vesículas, pero si el animal ha sobrevivido más tiempo aparecen con costras (7,22).

Los linfonodos de las regiones afectadas, principalmente los de la cabeza, los axilares y los prefemorales se encuentran aumentados de tamaño (22,28), con una inflamación intensa (25), son sólidos (7,22), hemorrágicos (45) y su consistencia es firme (7), aunque otros autores hablan de una consistencia más bien lardácea (25).

Otros hallazgos importantes son conjuntivitis y rinitis purulentas (7,25), así como balanopostitis en el macho o vulvitis edematosa en la hembra (28).

El escroto se encuentra inflamado (25,28,45), no así el testículo en opinión de algunos autores (25,28,45), aunque otros sostienen que sí hay orquitis (21).

En la forma atenuada sí hay inflamación tanto de testículos como de ovarios (2).

En el bazo se observa hiperplasia (25,28) y congestión (45). En el corazón y los pulmones se pueden observar focos mixomatosos específicos (25), estos últimos pueden estar además edematosos y en

algunos casos presentar bronconeumonía por infección bacteriana secundaria (8).

#### 1.10.2) Lesiones microscópicas:

Los mixomas están compuestos por un tejido fundamental mixomatoso, células mixomatosas específicas, glóbulos rojos y blancos y el tejido originalmente presente (25). Los glóbulos blancos presentes son elementos polinucleares (28). El nombre de células mixomatosas es utilizado por varios autores (8,25); la descripción de estas células coincide con la que otros autores dan para el tipo de células que predominan en la lesión y que la caracterizan, son células grandes y de aspecto estrellado (8,22,28,45) que aparentemente proceden de células mesenquimatosas (25); incluso Fain-Binda et al. (1986) se refieren a éstas como células mesenquimatosas indiferenciadas y Fenner et al. (1974) las llaman citan como fibroblastos. Dichas células están localizadas en el corion alrededor de los vasos sanguíneos (22) y se encuentran embebidas en una sustancia gelatinosa homogénea constituida casi en su totalidad por mucina (45); por otro lado, Mascaro (1974) sostiene que en los mixomas es común encontrar ácido hialurónico, lo que, según él, los diferencia de los tumores verdaderos y recuerda más bien a las enfermedades del colágeno. Duclos et al. (1983) afirman que se produce un edema en la dermis que causa la disociación y destrucción de las fibras colágenas y elásticas.



El núcleo de las células mixomatosas está aumentado de tamaño y muestra mitosis, en el citoplasma hay gránulos que aparentemente corresponden a material ingerido (22). Las alteraciones observadas en el corion han sido llamadas degeneración mixomatosa (7).

El origen de las lesiones características de la mixomatosis, llamadas por Fenner et al. (1974) con el nombre de fibromas es atribuida por ellos a "la extensiva proliferación de los fibroblastos en la dermis".

En cuanto al epitelio se observa que se produce un aumento en el número y tamaño de las células en el estrato de Malpighii (22), notándose además un engrosamiento y alargamiento de los folículos pilosos o una hiperacantosis (8).

Fenner et al. (1974), sin embargo, afirman que no se produce proliferación de las células epiteliales.

El virus muestra un tropismo hacia los epitelios y produce en éstos necrosis focales (8), además las células epiteliales muestran vacuolas (45). La formación de vesículas que se da (7,22), obedece, según Dos Santos (1982), a la degeneración hidrópica que sufren las células del epitelio. El núcleo puede estar hinchado o vacuolado y presenta fragmentación en la cromatina (22), adquiriendo un aspecto atigrado (2).

Una de las alteraciones características de las células epiteliales es la existencia de inclusiones intracitoplasmáticas eosinofílicas (2,9,22,25,28,45) llamadas por Duclos et al. (1983) cuerpos de Splendore que son, de acuerdo a ellos, característicos de las infecciones poxvirales; estas inclusiones son llamadas

cuerpos elementales (45) y pueden llegar a llenar el citoplasma (22), hallándose a veces en el núcleo (28), dichos cuerpos presentan dentro de sí elementos más pequeños que se tiñen de azul (22,45) y que poseen forma cocoide (45).

Por otro lado, Dos Santos (1982) afirma que "en las células epiteliales aparecen a veces unos corpúsculos intracitoplasmáticos alargados y basófilos denominados corpúsculos de Rivers".

Los vasos sanguíneos en el mixoma se observan inflamados con congestión y hemorragias (45), en algunos vasos aumenta el número y tamaño de las células endoteliales (22), además los vasos se encuentran dilatados y pueden presentar necrosis fibrinoide ocasionada por una trombosis, se observa también una neuritis (8). Además frecuentemente se presentan microabcesos en la dermis (7).

En los linfonodos ocurre hiperplasia de las células linfoides, la médula se encuentra edematosa, sobre todo alrededor de los vasos sanguíneos y contiene neutrófilos, heterófilos, células mononucleares, fibroblastos y células mixomatosas. También puede haber pérdida de muchos linfocitos y crecimiento de células endoteliales entremezcladas con islas de neutrófilos que reemplazan el tejido del linfonodo (22).

Lesiones similares a las que se dan en la piel se observan en los genitales externos, también puede verse infectado el endometrio o el conducto seminal del testículo (2).

En el hígado usualmente pueden aparecer los cuerpos de inclusión (4).

En la forma pulmonar de la mixomatosis se observa una alveolitis exudativa y una reacción edematosa. Destaca la ausencia de inclusiones intracitoplasmáticas y de lesiones neurovasculares (8).

Según Duclos et al. (1983) en las formas más recientes de la enfermedad no se observan tantos casos cutáneos con la formación de mixomas, sino que predomina una reacción edematosa. En cuanto a la forma pulmonar el edema observado es similar tanto para la forma clásica de la enfermedad como para las más recientes.

#### 1.11) Diagnóstico:

A nivel de campo son de mucho valor diagnóstico las características clínicas y epizootiológicas de la enfermedad si ésta se presenta en su forma clásica (2,21,25,29,31,39). Además, los hallazgos anatomo e histopatológicos constituyen un método de diagnóstico importante (2,9,28,29,31,39).

Si la muerte no se produce antes de los 8 a 10 días después de la infección es posible utilizar pruebas serológicas para la detección de anticuerpos (2), las más utilizadas son: Fijación de Complemento, Precipitación en Agar-gel (2,25), Inmunofluorescencia Indirecta, ELISA (2) y Seroneutralización vírica (25).

Tozzini (1975) reporta un incremento de la actividad de la enzima alfa 1-4 glucosidasa en el suero de conejos afectados de mixomatosis, por lo que podría pensarse en la determinación de sus niveles séricos como método de diagnóstico para la enfermedad, sin

embargo este autor hace la salvedad de que ese aumento se observa también en conejos que sufren de coccidiosis hepática o pasteurellosis.

Uno de los métodos de diagnóstico viral más usado es el aislamiento en huevos embrionados (2,31,39,45,49) o en cultivos celulares originados de conejos (9,39,45,49) o de otros mamíferos como ardillas, ratas jóvenes, cricetos, cobayos y de algunos tejidos humanos (45). También se utiliza la inoculación en conejos para reproducir la enfermedad (28,49).

La inoculación en los huevos embrionados de gallina, se realiza en la membrana corioalantoidea (9,49) y se utilizan, según Tozzini y Mani (1975), huevos de 8 días de incubación, los cuales después de la inoculación deben ser incubados por 7-10 días más a 37° C. Más recientemente Fain-Binda et al. (1986) utilizaron huevos de 12 días, los cuales luego de la inoculación incubaron 72 horas a 37° C.

La obtención y el procesamiento de las muestras para la inoculación es similar tanto para huevos embrionados como para cultivos celulares, después del sacrificio de los animales se extirpa tejido de los mixomas y se tritura en mortero, luego se pone en una solución con antibióticos y se centrifuga, utilizando el sobrenadante como inóculo (9).

El cultivo celular a inocular puede ser un cultivo primario de células de conejo (9) o bien uno derivado de alguna línea celular específica de conejo (49), en ambos casos las células deben incubarse por un período de 4 a 5 días a 37° C antes de ser

inoculadas (9,49). Se recomienda el uso de cultivos celulares sin inocular como controles negativos de la prueba (9).

Como punto de referencia se citarán los resultados de los dos estudios a los que hemos venido refiriéndonos en cuanto a los hallazgos en huevos embrionados y en los cultivos celulares.

En los huevos embrionados Tozzini y Mani (1975) reportan lesiones solo en algunos de los huevos inoculados, estas consisten en la presencia de un nódulo blanquecino en la membrana corioalantoidea en el punto de inoculación, así como la presencia de múltiples lesiones pequeñas diseminadas en la membrana; además informan que en los huevos afectados el embrión no muere. Por su parte Fain-Binda et al. (1986) encontraron que en las membranas corioalantoideas inoculadas se presentaron "lesiones pustulosas pequeñas a simple vista, pero evidentes por estereoscopia (30x)".

En cuanto a los cultivos celulares Tozzini y Mani (1975) hallaron alteraciones focales en la monocapa al final del primer pasaje, que fueron más evidentes en los pasajes sucesivos; la inoculación se hizo con la Cepa Pisa 73 del Virus de la Mixomatosis. En el otro estudio se encontró que las monocapas celulares inoculadas con material de la piel y de las membranas corioalantoideas infectadas con el virus presentaron redondeamiento celular, lisis y desprendimiento, efectos que comenzaron a aparecer a las 72 horas postinoculación.

La microscopía electrónica representa otro método de laboratorio de gran valor diagnóstico, sobre todo a nivel de investigación. Se utilizó en los estudios de Fain-Binda et al.

(1986) para lograr una caracterización más certera del virus a partir de los cultivos celulares infectados y para observar los tejidos afectados de los animales enfermos, en ambos casos la visualización se realizó a 25000 aumentos. La muestra que se usó a partir de los cultivos fue el sobrenadante de éstos, el cual fue observado por tinción negativa, evidenciándose partículas virales maduras e inmaduras, las primeras presentan forma ovoidea y miden aproximadamente 250 nm, las segundas son esféricas y con áreas de condensación interna; por su morfología y tamaño estos investigadores determinaron que los virus observados "corresponden con miembros de la familia Poxviridae".

#### 1.12) Tratamiento:

La mayoría de los autores coinciden en que no existe tratamiento (21,25,26,27,28), sin embargo se ha demostrado que el virus de la mixomatosis es sensible *in vitro* a la 6-azauridina, que es un análogo de la uridina y que posee un efecto antiviral específico sobre ciertos virus (48). Además, ha sido reportado que la Beta-fenilserina disminuye levemente la presentación de la enfermedad y de la muerte por su causa (52). La terapia con antibióticos, tendiente a evitar la contaminación bacteriana secundaria puede mejorar las perspectivas de sobrevivencia de los animales, principalmente en la forma pulmonar de la enfermedad (2).

### 1.13) Prevención:

Las medidas aplicadas contra la enfermedad pueden ser divididas en profilaxis sanitaria y profilaxis médica.

#### 1.13.1) Profilaxis sanitaria:

Está orientada a impedir la difusión del virus y su entrada a los establecimientos cunícolas.

Una de las medidas de prevención más importante es el control de los vectores (2,21,25,26,31). En este sentido es necesario controlar ectoparásitos de los conejos (9,21,25,26) utilizando para ello los productos comerciales que para este fin existen. También es importante el control de los dípteros hematófagos en las regiones en que éstos representan un problema (20,21,25,31), además en relación con este punto se debe tener en cuenta la presentación estacional de la enfermedad, que muchas veces se relaciona al incremento de los vectores en ciertas épocas (25).

Harwood y James (1987) citan algunas medidas específicas que se pueden aplicar para el control de mosquitos:

a) Evitar la presencia de aguas estancadas; para ello deben eliminarse los recipientes artificiales que puedan causar este efecto, se deben construir drenajes para los estanques o bien asegurarse de que en éstos existan peces depredadores.

b) Las construcciones deben contar con mallas metálicas en las áreas abiertas al exterior con el fin de impedir la entrada de insectos.

c) Utilizar insecticidas aprobados para el combate de los insectos. La aplicación de éstos debe hacerse en las superficies con las que el vector probablemente tenga contacto, o bien en forma de aerosol en los lugares ya infestados.

Otros aspectos de la profilaxis sanitaria están orientados a evitar las otras vías de transmisión posibles (por contacto directo, vía aerógena, secreciones o materiales contaminados).

Dado que en la forma amixomatosa de la enfermedad se presentan síntomas muy leves y su evolución es lenta, se debe mantener aislado y vigilado cualquier animal nuevo introducido al establecimiento, por lo menos por un período igual al de incubación de la enfermedad (2), o todavía mejor, por el equivalente en tiempo a dos veces el término medio de incubación de la enfermedad.<sup>1</sup>

En las regiones donde la enfermedad es enzoótica, se debe proceder a la eliminación de los animales sospechosos de sufrir la enfermedad (2,25). En aquellos países libres de la mixomatosis las medidas deben ser más drásticas y estar orientadas a la eliminación de todos los conejos de la explotación en la cual aparece un brote, así como también de todos aquellos que se encuentren en un círculo determinado alrededor de ese establecimiento (25).

---

<sup>1</sup> Comunicación Personal. Dr. Luis Vargas, Infectología. Escuela de Medicina Veterinaria, UNA (1994).



Si se utilizan plantas cultivadas al aire libre como fuente de alimento para los conejos, se debe asegurar que éstas no hayan sido contaminadas por conejos silvestres (25).

La desinfección de los materiales y objetos contaminados debe hacerse con formalina del 2 al 3%, o bien con cloruro cálcico, cloramina bruta o solución caliente de sosa del 3 al 5%; así mismo y a pesar de la desinfección, estos materiales no deben tener contacto con los animales susceptibles durante al menos 8 semanas (25).

Los animales muertos o sacrificados a causa de la enfermedad deben enterrarse, o mejor aún, incinerarse (25,27).

Para el control del helminto *Graphidium strigosum*, cuya presencia en los conejos aumenta la susceptibilidad a la mixomatosis, parecen ser efectivos los benzoimidazoles (42).

La aplicación de las medidas sanitarias profilácticas puede mantener un establecimiento limpio de la enfermedad sin la aplicación de vacunas, aun durante una epidemia (25).

### **1.13.2) Profilaxis médica:**

Se refiere a la vacunación contra la enfermedad; existen dos tipos de vacuna, la vacuna homóloga, que contiene el virus vivo de la mixomatosis atenuado y la vacuna heteróloga, preparada con el Virus del Fibroma de Shope (2,9,25,26,31).

i) Vacuna homóloga: contiene cepas del virus de la mixomatosis que han sido atenuadas por calor (28) o por pasajes sucesivos en embriones de pollo o cultivos celulares (2).

La inmunidad se instaure de 3 a 5 días después de la aplicación de la vacuna, la cual debe realizarse alrededor del día 30 a 35 de vida del animal (edad del destete) y la inmunidad conferida varía según la vía de aplicación: por vía intradérmica se obtiene una inmunidad que oscila de 2 a 4 meses, mientras que por vía subcutánea se prolonga de 6 a 12 meses (2). Se ha de tomar en cuenta que algunas cepas pueden producir una pequeña reacción local en el punto de inoculación.

Aunque esta vacuna provee inmunidad de tipo humoral, se considera que es más importante la inmunidad celular (principalmente la mediada por macrófagos), para cuya instauración es primordial que se evite una hipersensibilidad de tipo retardado (2).

En las conejas los anticuerpos circulantes logran pasar al feto (12), de manera que los gazapos hijos de madres vacunadas nacen con una inmunidad pasiva que se prolonga hasta alrededor del día 25 de edad (2), este factor debe tenerse en cuenta para determinar la edad de primera vacunación. El uso de la vacuna homóloga como primera vacunación contra la mixomatosis se recomienda en aquellos establecimientos con un alto riesgo de que ingrese la enfermedad o en aquellos en que está presente. Como sucede con cualquier otra vacuna los animales a los que se les aplica deben estar sanos (2).

Aunque la vacuna homóloga ha sido utilizada principalmente en Europa Oriental (26), recientemente en Francia se está ensayando un novedoso método para su aplicación principalmente a los conejos silvestres de Europa, éste consiste en la inoculación de la cepa atenuada SG 33 a las pulgas *Spilopsyllus cuniculi*, pretendiéndose reproducir esta pulga a gran escala para luego liberarlas en la naturaleza como un método para inmunizar la población susceptible (36).

ii) Vacuna heteróloga: está preparada con el Virus del Fibroma de Shope, que es un poxvirus de los conejos emparentado antigénicamente con el Virus de Mixomatosis (2,21,25,50,52) y que en los conejos de la especie *Oryctolagus cuniculus* produce un fibroma benigno (2,45,50,52).

Para la vacunación se pueden utilizar principalmente dos tipos de cepas vivas, la Cepa Original A de Shope (OA) o la Cepa Boerlage, que es una variante de la primera mantenida viva por pasajes en conejos por vía intradérmica (2), siendo segunda cepa la de uso más común (25) y la más utilizada en Europa Occidental (26). La actividad de la vacuna puede evaluarse a los 14-21 días después de su aplicación (2,3). En el punto de aplicación de la vacuna aparece un pequeño nódulo o tumoración de carácter benigno (2,21,26), el cual se ha asociado a la actividad de la vacuna, es por eso que para promover su formación algunas vacunas contienen una sustancia inflamatoria no absorbible, con esto se ha logrado incrementar la inmunidad que era de un 50% hasta un 70% (2). Este fenómeno se explica quizás por el hecho de que la vacuna heteróloga

confiere una inmunidad de tipo celular (2) y el principio general de la vacuna se basa en que las células infectadas por el virus del fibroma ya no serán infectadas por el virus de la mixomatosis (25).

La vacuna heteróloga puede ser aplicada por vía subcutánea (2), intradérmica (2,3,21) o por escarificación de la piel (3). La aplicación de la vacuna potenciada con la sustancia no absorbible provee una inmunidad de hasta 12 meses por vía subcutánea (2); por las otras dos vías se habla de una protección de 3-4 meses, lo cual cubre el período de engorde en criaderos intensivos (2,3). Sin embargo, Hime y O'Donoghue (1984) sostienen que la vacuna aplicada por la vía intradérmica brinda una protección de hasta 12 meses utilizada en gazapos a partir del séptimo día de edad; en este último aspecto también difieren de Bruguere (1992), quien sostiene que la vacunación con virus heterólogo no debe realizarse antes de las 3 semanas de edad ya que existe el riesgo de producir una fibromatosis, recomendando entonces su aplicación a partir del día 35 de edad, revacunando a los animales de 6 a 8 semanas después, para luego vacunar con virus homólogo en intervalos de 4 meses en los animales reproductores. Este autor también aconseja utilizar vacunas heterólogas como primera vacunación solamente en aquellos establecimientos que carecen de la enfermedad y que no son considerados de alto riesgo.

Tanto para la vacuna homóloga como para la heteróloga, se debe tener en cuenta que si se presentan casos de mixomatosis en un período de 3 semanas después de la vacunación, éstos se pueden

haber debido a que la enfermedad estaba en período de incubación (2).

Aunque las medidas profilácticas de carácter sanitario representan un gran aporte en el control de la enfermedad, la vacunación también es muy importante para esta labor. Ejemplo de esto es la antigua Alemania Oriental, en donde anteriormente estaba prohibida la vacunación (25), pero a partir de 1981 se introdujo la vacuna y se aplicó en base a una regionalización epizootiológica, registrándose una disminución de un 60% en la incidencia de la enfermedad en los 3 primeros años de aplicación (6). Este plan de vacunación, que era parte de una estrategia de erradicación, permitió, junto con otros factores, que se duplicara la producción de conejos en ese país entre 1982 y 1985 (46).

#### 1.14) Criterio para la inspección de carnes:

Este es otro aspecto de interés veterinario al que hacemos referencia como parte de la revisión de las características generales de la enfermedad.

La carne de los conejos sacrificados por padecer mixomatosis o por ser clínicamente sospechosos de sufrirla no debe ser consumida y tiene que ser destruída (26,51); sin embargo, la de aquellos animales clínicamente sanos pero que fueron sacrificados por ser sospechosos de encontrarse contagiados, puede destinarse al consumo humano propio, pero no a su salida al mercado (25). A los mataderos llegan por lo general casos en estadíos iniciales de la

enfermedad y aún así esta carne debe considerarse como insalubre y no apta para el consumo (10).

#### 1.15) La mixomatosis como método de control biológico para las poblaciones de conejos:

En algunos países los conejos silvestres se han convertido en una plaga, principalmente en aquellos en los que no existían en forma natural y fueron introducidos por el hombre, adaptándose luego al ambiente y diseminándose por el mismo. En este caso el problema es más grave debido a que en esos ecosistemas no existen depredadores naturales ni medios de control biológico sobre la población de conejos, la cual crece desproporcionadamente y ocasiona graves trastornos ecológicos al competir con los animales nativos y al consumir muchos forrajes naturales (45). Por otro lado, constituyen un problema económico pues afectan actividades productivas del hombre, este ha sido el caso de Australia y Nueva Zelanda (18).

El uso del virus de la mixomatosis para controlar la población de conejos se ha considerado por varias razones (23):

- a) Produce una enfermedad altamente selectiva que no va a ocasionar daño a otras especies.
- b) La mayoría de los venenos que se pueden utilizar para el control de los conejos no son muy selectivos y pueden afectar a otros animales.

c) El costo de realizar cíclicamente envenenamientos es muy alto, mientras que la introducción del virus resulta relativamente económica.

d) La diversidad de vectores del virus garantizaría una amplia diseminación de éste en el medio ambiente, además como medida adicional la introducción de la pulga del conejo (*Spilopsyllus cuniculi*) no representaría un gran impedimento para la aplicación de este método de control biológico.

Sin embargo también han sido señalados cuestionamientos sobre el uso de la enfermedad para el control de los conejos:

a) Desde el punto de vista ético se considera que el bienestar animal es una de las metas de la profesión veterinaria y esta enfermedad causa dolor y sufrimiento a los animales por al menos 8 días (18,19).

b) En las regiones en donde no existen vectores se debe introducir la pulga del conejo (*Spilopsyllus cuniculi*), lo cual constituye otra alteración de los ecosistemas (19).

c) Después de introducir el virus posiblemente permanecerá de por vida en el ecosistema (19).

d) Se ha demostrado que las cepas del virus se van atenuando a lo largo del tiempo mediante pasajes por los conejos y que éstos además van adquiriendo resistencia genética contra la enfermedad (18,19,25,31).

e) Existen otros métodos disponibles para controlar la población de conejos (18).

f) Los conejos llegan a ser parte del medio y son problemáticos solo en algunas áreas (18).

g) Por la introducción de la enfermedad a un país libre, se puede afectar el mercadeo y exportación de los conejos y sus subproductos (15).

## 2) La mixomatosis en Costa Rica:

Según el Anuario de Sanidad Animal de FAO, OIE y WHO de 1992., la mixomatosis es enzoótica en Costa Rica y pertenece al grupo de las "enfermedades transmisibles que se consideran importantes desde el punto de vista socioeconómico y/o sanitario para las economías nacionales y cuyos efectos para el comercio internacional de animales y productos pecuarios no son desdeñables".

El Programa de Adiestramiento en Salud Animal para América Latina patrocinado por la OPS, OMS y el BID, en el volumen 1 de las publicaciones de Cuarentena Animal llamado Enfermedades Cuarentenables, sostiene que la distribución de la mixomatosis es mundial y cita además una serie de países en donde la enfermedad se observa "particularmente", entre éstos se encuentra Costa Rica.

Es de acuerdo a esta información internacional que el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) considera la mixomatosis como una enfermedad enzoótica en Costa Rica, sin



embargo, carece de estudios que hayan demostrado la presencia del agente en el país.<sup>2</sup>

A pesar de no ser considerada una enfermedad exótica, la mixomatosis es de denuncia obligatoria según lo establece el artículo 5 del Reglamento de Defensa Sanitaria Animal de Costa Rica. Además, el artículo 32 del mismo reglamento indica que para la importación de animales y sus subproductos, éstos "deberán venir amparados por un certificado de sanidad expedido por la autoridad sanitaria competente del país de origen". Para el caso específico de los conejos, ese reglamento en su artículo 60 establece que este certificado debe especificar que los animales provienen de granjas libres de mixomatosis. En el mismo sentido también el artículo 165 del Reglamento para la Evaluación y Aprobación de Productos y/o Subproductos de Origen Animal Importados por Costa Rica señala que: "En el Certificado Veterinario Oficial se hará constar que los conejos se encuentran libres de enfermedades infectocontagiosas especialmente Mixomatosis, Tularemia y Enfermedad Viral Hemorrágica (UHD)".

También existen normativas internacionales para la prevención de la mixomatosis en importaciones. Para los animales vivos se establece que no deben presentar signos clínicos el día del embarque y que desde su nacimiento o 6 meses antes de su exportación, permanecieron en una explotación en donde no se comprobó la enfermedad en ese período. Para la importación de

---

<sup>2</sup> Comunicación Personal. Dra. Miriam Jiménez. Jefe del Departamento de Cuarentena Animal, MAG. (1994).

pieles y pelos de conejos domésticos y salvajes debe presentarse un Certificado Sanitario Internacional en el que se haga constar que fueron sometidos a un tratamiento que garantice la destrucción del virus de la mixomatosis (32,33).

En un estudio retrospectivo realizado en el archivo del Laboratorio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, se encontró que desde el año 1977 aparecen casos de conejos diagnosticados como mixomatosis después del estudio anatómico e histopatológico. A un total de 15 conejos se les diagnosticó la enfermedad desde ese año, hasta 1992.

Por otro lado existen comunicaciones de cunicultores y médicos veterinarios que desde hace varios años vienen observando en conejos cuadros clínicos compatibles ampliamente con los descritos para la enfermedad, principalmente con la forma clásica. En la zona de San Carlos, por ejemplo, la mixomatosis (identificada como tal por sus características clínicas) ha sido responsable del fracaso de varias conejeras pues causa una alta mortalidad en la población que afecta.<sup>3</sup>

Sobre la mixomatosis en Costa Rica, no se han encontrado hasta el momento referencias de investigaciones orientadas hacia el cultivo y aislamiento viral, tampoco se tienen datos con respecto a estudios serológicos de la enfermedad, ni de intentos de demostrar por microscopía electrónica la presencia del virus en aislamientos virales logrados a partir de conejos enfermos. Sin

---

<sup>3</sup> Comunicación Personal. Sr. Alfonso Reyes. Cunicultor de la zona de San Carlos. (1993).

embargo, en Panamá y Colombia se ha identificado el virus y se ha visto que se encuentra más relacionado con las cepas Californianas que con las Suramericanas (52).

Considerando la vacunación como uno de los aspectos de interés en la profilaxis de la mixomatosis en Costa Rica, se pudo verificar con el MAG que en la actualidad no existe ninguna vacuna en el país.<sup>4</sup> Como la enfermedad es considerada por el MAG enzoótica en Costa Rica, eventualmente sería posible importar la vacuna, ya que el Reglamento de Defensa Sanitaria Animal prohíbe solo la importación de biológicos de países afectados por enfermedades exóticas, o bien obtenidas a partir de animales susceptibles a la fiebre aftosa (artículos 65 y 94). No obstante, para concretar la importación de la vacuna se debe contar con la aprobación de la División de Salud Animal del MAG, que en última instancia determinará si es o no necesaria (artículo 44).

---

<sup>4</sup> Comunicación Personal. Dra. Miriam Jiménez. Jefe del Departamento de Cuarentena Animal, MAG. (1994).

## Material y Métodos

### 1) Estudio retrospectivo:

#### 1.1) Recopilación de los casos de mixomatosis:

El estudio retrospectivo fue realizado en el archivo del Laboratorio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional y consistió en una revisión caso por caso, a través de sus hojas de diagnóstico, de todos los animales a los que se les ha practicado la necropsia ese laboratorio desde el inicio de sus funciones en 1976 hasta 1992.

#### 1.2) Estudio histopatológico:

En los casos del estudio retrospectivo encontrados con el diagnóstico de mixomatosis, se realizó una nueva revisión histopatológica utilizando para ello las láminas de los cortes existentes en el archivo y cuando éstas no eran suficientemente claras o estaban deterioradas, se hicieron nuevos cortes a partir de los bloques de parafina que conservan los tejidos fijados para cada caso. El procedimiento usado para su análisis, corte y tinción, fue similar al que se describirá posteriormente para los conejos analizados en el estudio prospectivo. La única diferencia es que las lesiones encontradas no fueron descritas tan detalladamente como las correspondientes a estos últimos.

## 2) Estudio prospectivo:

### 2.1) Obtención de los animales:

Durante el año 1993 y primeros 5 meses de 1994 se obtuvieron animales sospechosos de sufrir mixomatosis por los síntomas clínicos que presentaban. Estos animales fueron remitidos por algunos cunicultores que tenían conocimiento del desarrollo de esta investigación.

### 2.2) Estudio anatomopatológico:

Cuando los animales remitidos estaban vivos, se procedía a su eutanasia para realizarles la necropsia. En el transcurso de ésta se observaron y anotaron las lesiones macroscópicas presentes, así mismo se obtuvieron fotografías de éstas.

### 2.3) Estudio histopatológico:

#### 2.3.1) Recolección y procesamiento de las muestras:

Durante la necropsia se recolectaron porciones de 2-3mm de ancho por 1cm de largo de los tejidos que macroscópicamente presentaban las alteraciones características de la enfermedad. Se fijaron en formalina al 10%, permaneciendo en esta solución por un

mínimo de 24 horas. Posteriormente se procedió a orientar la muestra del tejido a procesar a través de un afinamiento del corte, luego esta muestra fue llevada a la máquina procesadora del tejidos para deshidratarla a través de su paso por alcohol de 80°, de 95°, de 100° y por xilol. En cada uno de estos alcoholes los tejidos permanecieron por 2 horas, después se introdujeron en parafina líquida por el mismo período. Luego se hizo su inclusión en bloques utilizando para ello moldes de metal con una base plástica. A partir de estos bloques se obtuvieron cortes de 4-5 micras de grosor con un micrótomo de rotación, los cuales se pusieron en un baño maría para evitar que su contracción y lograr así colocarlos en un portaobjetos. Después, ya en el portaobjetos, se secaron en una estufa a 56° C por 2 horas y posteriormente se tiñeron con la técnica de rutina de hematoxilina-eosina. Para esta técnica se requirió desparafinar los tejidos lo cual se logra exponiéndolos por 2 minutos a xilol, alcohol de 100°, de 95° y de 80° en ese orden. Por cada uno de estos reactivos los cortes pasaron dos veces para evitar la contaminación del alcohol absoluto. Luego se procedió a la tinción propiamente dicha, la cual se realizó con hematoxilina de Harris y eosina pícrica; después, para fijarlos, los cortes se sometieron al mismo procedimiento realizado para desparafinarlos pero utilizando los alcoholes en el orden inverso. Por último se montaron usando Permount como pegamento y fueron colocados en el cubreobjetos.

### 2.3.2) Estudio de los tejidos:

Los cortes obtenidos se evaluaron por microscopía óptica de luz para observar, anotar y fotografiar las principales lesiones histopatológicas típicas de la mixomatosis que se visualizaron.

### 2.4) Diagnóstico etiológico por medio del aislamiento viral:

#### 2.4.1) Recolección de las muestras:

En el transcurso de la necropsia se recogieron muestras de los tejidos macroscópicamente afectados para intentar el aislamiento del Virus de la Mixomatosis. En estas muestras se pretendió que no existiera mucha contaminación bacteriana secundaria (evidente por un exudado purulento). Estos tejidos fueron trasladados de inmediato al Laboratorio de Virología y cuando ésto no era posible se congelaban.

#### 2.4.2) Preparación del inóculo:

En el Laboratorio de Virología se reunieron todos los tejidos aportados de cada animal y se maceraron en un mortero con arena de cuarzo en el medio de cultivo DMEM Sigma<sup>®</sup>, con los antibióticos penicilina (100 UI/ml) y estreptomycinina (100 ug/ml) además del antimicótico anfotericina-B (2.5 ug/ml). Posteriormente se

depositó el material en un tubo cónico de plástico estéril de 15 ml y se centrifugó 10 minutos a 4000 rpm para sedimentar los detritos, siendo el sobrenadante obtenido lo que se utilizó para inocular.

#### 2.4.3) Inoculación de los cultivos celulares:

La inoculación se realizó en la línea celular EREp que es una línea de endotelio fetal de conejo. Estas células se encontraban en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con el medio DMEM con 10% de suero fetal bovino formando una monocapa adherida a la pared del recipiente. Antes de hacer la inoculación se eliminó el medio de la botella, luego se lavó con PBS para eliminar las células sueltas. Posteriormente se realizó el inóculo depositando primero 1 ml del medio DMEM para que existiera un colchón que amortiguara por dilución cualquier factor citotóxico y para que diera el volumen suficiente para cubrir la monocapa celular uniformemente y luego, 0.5 ml del sobrenadante de la muestra. En seguida las botellas inoculadas se incubaron durante 1 hora a 37° C y transcurrido ese tiempo se eliminó el inóculo, se volvió a lavar con PBS dos veces y se depositaron en la botella 5 ml del DMEM con 2% de suero fetal bovino para finalmente incubarlo a 37° C con 7% de CO<sub>2</sub>. Como control negativo se usó un cultivo celular que no fue inoculado, pero que fue tratado igual en todos los demás aspectos del procedimiento.



#### 2.4.4) Determinación del efecto citopático:

Cada 24 horas se evaluó el cultivo para observar si se presentaba algún efecto citopático. Si al cabo de una semana este efecto no se manifestaba se procedía a congelar la botella, se descongelaba para obtener de nuevo un sobrenadante que se usaba para una nueva inoculación. Esto se conoce como un pasaje. Si después de 3 pasajes no se observaba evidencia del efecto citopático, la muestra se consideraba negativa. En el momento en que se diera el efecto citopático en un cultivo se procedía a su congelación y posterior descongelación, luego era centrifugado para obtener un sobrenadante que se congela y se mantiene a  $-70^{\circ}\text{C}$  para conservar el virus por tiempo indefinido.

#### 2.4.5) Observación e identificación del virus por microscopía electrónica:

Para la observación del virus por microscopía electrónica se utilizó el sobrenadante de los cultivos celulares en que se dió el efecto citopático, este sobrenadante fue concentrado por ultracentrifugación a 27000 rpm en un rotor número 28 durante 2 horas en una centrifuga Beckman L7-35. El pellet obtenido se resuspendió en PBS, se colocó en una rejilla y fue teñido con una tinción negativa de ácido fosfotúngstico, para luego ser observado

en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H7100 a un aumento de 100000 X, ahí se identificaron las partículas virales por sus características morfológicas y posteriormente fueron fotografiadas.<sup>5 6</sup>

---

<sup>5</sup> Comunicación Personal. Dr. Carlos Jiménez, Virología. Escuela de Medicina Veterinaria, UNA. (1994).

<sup>6</sup> Comunicación Personal. Dra. Gaby Dolz, Virología. Escuela de Medicina Veterinaria, UNA. (1994).

## Resultados

### 1) Estudio retrospectivo:

#### 1.1) Recopilación de los casos de mixomatosis:

Por medio de la realización del estudio retrospectivo en el Laboratorio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, se pudo determinar que entre los años de 1976 y 1992 se realizaron 140 necropsias de conejos. Se encontró que el 10.7% de estos casos (15 animales) fueron diagnosticados como mixomatosis, ocupando así esta enfermedad el segundo lugar en los diagnósticos realizados en esta especie, siendo solamente superada por la coccidiosis.

#### 1.2) Estudio histopatológico:

A continuación se indican las lesiones histopatológicas halladas en cada uno de esos casos utilizando la numeración del archivo.

**Caso N°122-77:** (8-2-77). Corresponde a una coneja de raza y edad no determinadas procedente del bioterio de la Escuela de Medicina Veterinaria. En el epitelio de la nariz se observó vacuolización e inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas. En la dermis se presentó un edema rico en mucina, proliferación de

células mixomatosas y una respuesta inflamatoria proliferativa difusa a base de mononucleares y neutrófilos. En un corte de linfonodo fue posible observar necrosis, infiltración de células inflamatorias, edema y proliferación de células mixomatosas.

**Caso N° 306-77:** (10-10-77). Era un conejo mestizo de sexo masculino, 6 meses de edad y originario de Puerto Limón. En el epitelio y la dermis se observaron las mismas lesiones que en el caso anterior. El escroto presentaba degeneración vacuolar e inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas en el epitelio externo. En la dermis se encontró edema e infiltración difusa de eosinófilos al igual que en la túnica vaginal parietal, que además presentaba proliferación de las células mixomatosas.

**Caso N°322-77:** (27-10-77). En este caso se trataba de un animal de 3 meses de edad, raza Nueva Zelanda, cuyo sexo no fue determinado y que provenía de Venecia de San Carlos. En la oreja se observó que en el epitelio externo hay una degeneración vacuolar con formación de pequeñas vesículas, además hay inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas e infiltración de eosinófilos; en la dermis se evidenció la existencia de un fuerte edema con mucina, también hemorragias e infiltración eosinofílica difusa y en forma de microabscesos.

**Caso N°446-78:** (9-5-78). Para este conejo no fueron determinados el sexo, raza y edad; fue traído de Poás. En el epitelio de la piel se presentaba degeneración vacuolar e inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas; en la dermis edema, reacción inflamatoria eosinofílica en forma de microabscesos, hemorragias y células mixomatosas estrelladas. La oreja presentaba en el epitelio y la dermis las mismas lesiones que en la piel.

**Caso N°574-78:** (9-10-78). En este caso, que era una hembra mestiza de 9 meses de edad procedente de Ciudad Quesada, no se fijó material para histopatología por lo cual las lesiones microscópicas no fueron determinadas. El diagnóstico de mixomatosis que en su oportunidad se dio fue hecho con base en las lesiones anatomopatológicas.

**Caso N°1136-81:** (28-5-81). Se trataba de un conejo de sexo masculino cuya raza, edad y procedencia no fueron determinadas. En el párpado había una hiperplasia epitelial con degeneración vacuolar, inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas e infiltración de eosinófilos, existían además erosiones y úlceras, siendo las lesiones del epitelio interno más marcadas que las del externo; la dermis presentaba infiltración eosinofílica difusa, edema y proliferación de células mixomatosas. En el escroto se observó degeneración vacuolar e inclusiones en el epitelio, edema en la dermis e infiltración difusa de eosinófilos en las tunicas.

**Caso N°1654-83:** (17-2-83). Era una hembra mestiza de edad y procedencia no determinadas. El epitelio de la oreja manifestaba una hiperplasia con degeneración vacuolar y formación de vesículas, además inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas; en la dermis había edema, hemorragias, proliferación de células mixomatosas y una reacción inflamatoria mononuclear. En el pulmón se observó hiperplasia del epitelio bronquial, degeneración mixomatosa de la pared de los bronquios y de los vasos sanguíneos con proliferación de células mixomatosas, infiltración eosinofílica difusa, enfisema, hemorragias y edema de la pared bronquial.

**Caso N°1655-83:** (17-2-83). Este conejo era un macho raza California de 6 meses de edad al cual no le fue determinada su procedencia. Los cortes de nariz, párpado y piel presentaron prácticamente las mismas lesiones entre sí. El epitelio presentaba hiperplasia, degeneración vacuolar con formación de vesículas, erosiones y úlceras, también inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas e infiltración de eosinófilos. En la dermis se encontró edema, hemorragias, infiltración inflamatoria eosinofílica difusa y en forma de microabscesos, además, proliferación de células mixomatosas. Las lesiones en el párpado eran más intensas en el epitelio interno. En el escroto el epitelio era normal y en la dermis encontramos edema y microabscesos.

**Caso N°1718-83:** (21-4-83). Correspondió a un macho de 10 semanas de edad cuya raza y origen no fueron determinados. El epitelio de la nariz se encontró atrofiado, con inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas e intranucleares. Se observó también una degeneración vacuolar con formación de vesículas y una úlcera con material necrótico y contaminación bacteriana secundaria, además había una fuerte infiltración inflamatoria a base de neutrófilos y eosinófilos. En la dermis existía edema, congestión, hemorragias una infiltración de células mixomatosas e inflamatorias (principalmente eosinófilos) en forma difusa que se extendía hasta la camada muscular. En las células de las glándulas sebáceas se observó degeneración vacuolar.

**Caso N°1778-83:** (16-6-83). Este animal era un conejo macho de raza, edad y procedencia no determinadas. En la piel el epitelio se observó degeneración vacuolar con vesículas y úlceras contaminadas con bacterias. Además, como parte de este cuadro habían inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas. La dermis e incluso las capas musculares superficiales presentaron edema, congestión, proliferación de células mixomatosas e infiltración eosinofílica difusa y en forma de microabscesos. El epitelio de la oreja estaba aparentemente sano, mientras que la dermis presentaba las mismas lesiones descritas para la piel.

**Caso N°1851-83:** (7-9-83). Era un cruce de las razas Nueva Zelanda y Gigante de 7 meses de edad y sexo masculino, el lugar de su procedencia no fue determinado. En la piel se encontró un epitelio hiperplásico, con inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas, degeneración vacuolar y formación de vesículas, pápulas y úlceras contaminadas con bacterias en forma secundaria. En la dermis y camadas musculares se observó edema, hemorragias, proliferación de células mixomatosas e infiltración difusa de eosinófilos y también en forma de microabscesos.

**Caso N°21-84:** (1-3-84). En este caso se trataba de una hembra raza California de 14 semanas de edad, procedente de la Uruca, San José. La nariz presentaba en el epitelio atrofia, degeneración vacuolar e inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas. En la dermis había edema e infiltración inflamatoria mononuclear difusa, también se encontraron algunos eosinófilos y cierta cantidad de mucina. En cuanto a las orejas y los párpados, en el epitelio se visualizó degeneración vacuolar e inclusiones y en la dermis edema y proliferación de células mixomatosas.

**Caso N°22-84:** (1-3-84). Era un conejo de raza California de 14 semanas de edad que fue traído de la Uruca. El epitelio nasal presentaba las inclusiones y degeneración vacuolar características y en este caso además había formación de vesículas. Las lesiones de la dermis en el corte de nariz se extendían hasta el músculo y consistieron en edema, infiltración de eosinófilos y proliferación



de células mixomatosas. En la piel se encontraron lesiones similares a las de la nariz, con la diferencia de que la dermis presentaba además, congestión, hemorragias y una reacción inflamatoria que además de eosinófilos estaba constituida también por mononucleares.

**Caso N°24-84:** (5-3-84). Esta era una coneja raza California de 14 meses de edad que procedía de la Uruca. El epitelio de la piel presentó las mismas alteraciones descritas en el caso anterior. En la dermis se observó edema, reacción inflamatoria difusa a base de eosinófilos y proliferación de células mixomatosas; las lesiones se extendían hasta el músculo. En el párpado se encontró, en el epitelio, una degeneración vacuolar e inclusiones y en la dermis edema y células mixomatosas. Tanto a nivel de epitelio como de dermis había una infiltración de eosinófilos en forma difusa y de microabscesos.

**Caso N°51-86:** (12-3-86). Correspondió a una hembra raza California de 5 meses de edad que era procedente de San José. El epitelio de la nariz se encontró muy afectado, presentando inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas e intranucleares, degeneración vacuolar con vesículas y pápulas, además habían costras con material necrótico y contaminación bacteriana secundaria. En la dermis se observó un edema rico en proteínas, además, hemorragias, proliferación de células mixomatosas y formación de microabscesos por infiltración de eosinófilos; estas

dos últimas alteraciones se prolongaban hasta el músculo. El párpado presentaba básicamente las mismas lesiones que la nariz, pero además inclusiones en las células de las glándulas sebáceas.

Resumiendo los datos anteriores se determinó que hubo cuatro lesiones que se encontraron en al menos uno de los tejidos afectados en los 14 casos en que se hizo histopatología durante el estudio retrospectivo. Estas lesiones son: degeneración vacuolar del epitelio, edema de la dermis, inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas en el epitelio e infiltración de células inflamatorias en los tejidos lesionados. La presencia de células mixomatosas en la dermis se observó en 13 de los casos, la hiperplasia del epitelio en 4 y la presencia de mucina o ácido hialurónico en la dermis en 3 de estos casos. En el cuadro N° 1 se muestra la distribución de la presencia de estas lesiones en cada uno de los casos.

## 2) Estudio prospectivo:

### 2.1) Obtención de los animales:

Gracias a la colaboración y el interés de personas que tenían conocimiento de la realización de esta investigación, se lograron obtener 5 conejos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) clínicamente sospechosos de sufrir mixomatosis, los cuales se encontraban en diferentes etapas de la enfermedad.

Cuadro No. 1: Lesiones microscópicas más importantes encontradas en la revisión de los casos del estudio retrospectivo.

Lesión	Hiperplasia del epitelio	Degeneración vacuolar del epitelio	Mucina o ácido hialurónico	Inclusiones intracelulares	Edema de la dermis	Células mixomatosas en dermis	Infiltración de células inflamatorias
No. de Caso							
122-77	-	+	+	+	+	+	+
306-77	-	+	-	+	+	+	+
322-77	-	+	+	+	+	-	+
446-78	-	+	-	+	+	+	+
574-78	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR	NSR
1136-81	+	+	-	+	+	+	+
1654-83	+	+	-	+	+	+	+
1655-83	+	+	-	+	+	+	+
1718-83	-	+	-	+	+	+	+
1778-83	-	+	-	+	+	+	+
1851-83	+	+	-	+	+	+	+
21-84	-	+	+	+	+	+	+
22-84	-	+	-	+	+	+	+
24-84	-	+	-	+	+	+	+
51-86	-	+	-	+	+	+	+

+ presente

- ausente

NSR no se realizó

## 2.2) Estudio anatomo patológico:

A continuación se detallan los principales datos y hallazgos de necropsia correspondientes a esos 5 animales.

**Animal N° 1:** Era un conejo joven de unos 2 meses de edad, mestizo y de sexo masculino. Procedía de Heredia y fue eutanasiado para realizar la necropsia. En ésta se encontraron mixomas bilateralmente en la base del pabellón auricular, en el párpado superior, y en el área anogenital. Estos mixomas se caracterizaron por el engrosamiento y edema de las estructuras afectadas. Acompañando la lesión parpebral se encontró también una blefaritis purulenta. Los pulmones se observaron congestivos.

**Animal N° 2:** En este caso se trató de una coneja mestiza adulta procedente de San José, cuya necropsia se realizó unas 12 horas postmortem, período durante el cual el animal se mantuvo en refrigeración. En el estudio anatomopatológico se destacó la presencia de lesiones nodulares confluyentes, edematosas y eritematosas con un engrosamiento de la dermis de unos 5 a 7mm aproximadamente, que se encontraron en forma generalizada en la piel. En los párpados se hallaron mixomas bilateralmente, así como una blefaritis secundaria con exudado purulento. En los labios, nariz, pabellones auriculares y la genitalia externa se observaron el engrosamiento y edema que caracterizan el mixoma.

**Animal N° 3:** Correspondió a una hembra mestiza adulta de edad desconocida originaria del mismo establecimiento que el animal número 2. La necropsia se hizo aproximadamente 12 horas postmortem durante las cuales el animal estuvo en refrigeración. Las lesiones macroscópicas de los párpados, orejas y genitalia son similares a las del caso anterior. Este animal no presentó lesiones cutáneas generalizadas.

**Animal N° 4:** Este caso era un macho de 7 meses de edad procedente de Ochomogo de Cartago, su raza era California y fue eutanasiado para la necropsia. Durante la misma se encontró bilateralmente la existencia de una blefaroconjuntivitis purulenta con necrosis de los párpados, los cuales además presentaban engrosamiento, edema y hemorragias equimóticas. Se observó también engrosamiento y edema en el escroto, los labios, las orejas y la nariz, en la que además había una rinitis caracterizada porque las fosas y cornetes nasales estaban llenos de un contenido purulento que impedía el libre paso de aire. Los linfonodos de la cabeza se encontraron aumentados de tamaño y edematosos.

**Animal N° 5:** Se trataba de un macho, raza Nueva Zelanda, adulto y cuya edad exacta era desconocida; este animal fue obtenido en Heredia y su necropsia se realizó 2 horas postmortem, durante ésta se observó bilateralmente edema y hemorragias petequiales en los párpados superior e inferior así como en el tercer párpado;

además, blefaroconjuntivitis purulenta, edema de los labios y escroto, principalmente en el lado izquierdo. En ambas orejas se presentaba edema y petequias principalmente en la base.

Las lesiones anatomopatológicas más frecuentes en estos cinco animales fueron: el mixoma en los párpados, en el pabellón auricular y en la región anogenital, así como la blefaritis purulenta. Estas lesiones estuvieron presentes en todos los casos y algunas de ellas pueden observarse en las figuras número 1 y 2.

El mixoma de los labios apareció en 4 de los 5 conejos, el mixoma de la nariz en 3 y las hemorragias en los párpados en 2. Los mixomas generalizados, la rinitis purulenta y la linfadenomegalia de los ganglios de la cabeza se presentaron solamente una vez. El cuadro N° 2 presenta un resumen de estos datos.

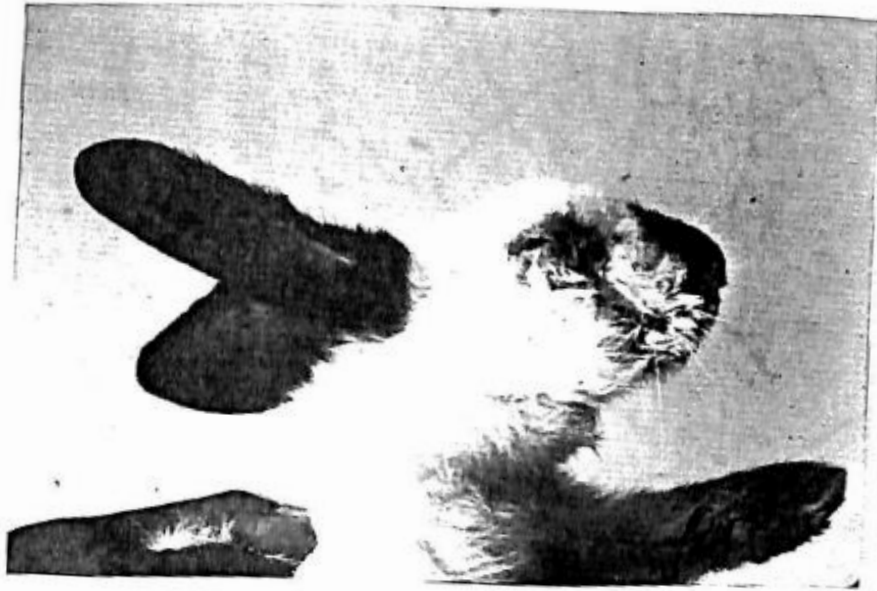


Figura Nº 1: Mixomatosis clásica. Se observan mixomas en los párpados y en la base del pabellón auricular.



Figura Nº 2: Pabellón auricular. Cortes transversales para mostrar el engrosamiento de la piel.

Cuadro No. 2: Lesiones macroscópicas más importantes encontradas en el estudio prospectivo.

Animal No.	1	2	3	4	5
Lesión					
Mixoma en los párpados	+	+	+	+	+
Mixoma en el pabellón auricular	+	+	+	+	+
Mixoma en la nariz	-	+	+	+	-
Mixoma en los labios	-	+	+	+	+
Mixoma en la región ano-genital	+	+	+	+	+
Mixoma generalizado	-	+	-	-	-
Blefaritis purulenta	+	+	+	+	+
Rinitis purulenta	-	-	-	+	-
Hemorragias en los parpados	-	-	-	+	+
Linfoadenomegalia	-	-	-	+	-

+ presente  
 - ausente



### 2.3) Estudio histopatológico:

Las lesiones microscópicas observadas en cada uno de los casos fueron las siguientes:

**Animal N° 1:** El exámen histopatológico del párpado reveló que la lesión se encontraba principalmente a nivel del epitelio interno. Éste presentaba una degeneración vacuolar leve con escasa presencia de inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas, además se observó una severa infiltración inflamatoria en el epitelio que estaba constituida principalmente por eosinófilos y algunos neutrófilos. La submucosa del epitelio interno tenía un edema moderado, así como una proliferación de células mixomatosas y una infiltración inflamatoria de eosinófilos leve.

En las orejas, el epitelio de la piel y de los folículos pilosos manifestaba una leve vacuolización y una leve presencia de inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas.

El pulmón se observó congestivo, con enfisema, focos neumónicos y con un infiltrado de células mononucleares.

**Animal N° 2:** De los epitelios del párpado se observó que la lesión más grave ocurrió en el interno. En éste existía hiperplasia, degeneración vacuolar moderada con formación de vesículas, hemorragias, una severa infiltración de eosinófilos y la presencia de inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas en forma moderada. La dermis del epitelio interno manifiestaba edema

moderado con una cantidad moderada de proteínas producto de la extravasación, una proliferación moderada de células mixomatosas, congestión vascular y una infiltración también moderada de eosinófilos en forma difusa y de microabscesos. Estas mismas lesiones fueron observadas en el epitelio externo, aunque de menor severidad, cuadro que se dio también en los folículos pilosos. La dermis presentó un edema leve y escasas células mixomatosas.

Los cortes de las lesiones nodulares generalizadas en la piel presentaron degeneración vacuolar e inclusiones en forma moderada en el epitelio, lo mismo sucedió en el epitelio de los folículos pilosos. En la dermis se registró un edema moderado con una leve proliferación de células mixomatosas y no se observó infiltración celular inflamatoria.

En las orejas se observó una lesión del epitelio similar a la de piel pero de carácter leve. Las inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas observadas presentaban una estructura central basófila.

En la vulva apareció una degeneración vacuolar severa y una presencia moderada de inclusiones en el epitelio interno; la submucosa presentaba un edema moderado rico en proteínas, además, congestión, hemorragias y una leve proliferación de células mixomatosas y de eosinófilos en forma difusa. El epitelio de la piel de la vulva y de los folículos pilosos de esa área presentó una degeneración vacuolar leve y pocas inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas.

**Animal N° 3:** Se observó que el párpado se encontraba más severamente lesionado en el epitelio interno que en el externo; así pues, internamente el epitelio presentaba pápulas, úlceras con tejido necrótico y contaminación bacteriana secundaria consecuencia de una degeneración vacuolar severa. En las células epiteliales la presencia de inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas era leve, además en el epitelio existía infiltración de eosinófilos en forma difusa y de microabscesos. La submucosa presentaba un severo edema rico en fibrina, hemorragias, una leve infiltración difusa de eosinófilos y una proliferación de células mixomatosas también leve. En cuanto al epitelio externo tenemos que la degeneración vacuolar era moderada y estaba acompañada de la formación de vesículas, pápulas, úlceras y una leve presencia de inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas. El epitelio de los folículos pilosos también se encontraba afectado. En la dermis se presentaba edema, infiltración difusa de eosinófilos y proliferación de células mixomatosas, todo en forma leve.

La vulva presentaba inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas y degeneración vacuolar leves en el epitelio externo y de los folículos pilosos. En la dermis cabe señalar que la presencia de eosinófilos era escasa, el edema moderado y existía una leve proliferación de células mixomatosas. La mucosa vulvar presentaba degeneración vacuolar e inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas escasas y en la submucosa había un edema leve y una escasa infiltración de eosinófilos sin que se observaran células mixomatosas.

**Animal N° 4:** Durante el estudio histopatológico se evidenció el daño en el epitelio interno del párpado con degeneración vacuolar y la presencia de inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas en forma moderada; se observó además la formación de vesículas, algunas de las cuales se encontraban llenas de eosinófilos. La infiltración de eosinófilos era severa y formaba microabscesos; además existía un aumento de la pigmentación en el epitelio. La submucosa o dermis del epitelio interno presentaba un severo edema rico en proteínas, también hemorragias, infiltración moderada de eosinófilos en forma difusa y una proliferación moderada de células mixomatosas; además, en las células del tejido glandular se observaron inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas. En el epitelio externo del párpado se pudo visualizar atrofia y degeneración vacuolar severa con formación de vesículas y úlceras; también se encontraron pocas inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas en el epitelio, folículos pilosos, y glándulas sebáceas, estas inclusiones presentaban una estructura basófila central de forma cocoide. La degeneración vacuolar severa se observó también en los folículos pilosos y glándulas sebáceas. La dermis presentaba edema moderado, leve proliferación de células mixomatosas y una moderada infiltración difusa de eosinófilos.

En la oreja el epitelio estaba afectado con una degeneración vacuolar moderada y una presencia leve de inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas. En la dermis se observó un severo edema rico

en proteínas, linfangiectasia y en forma leve, una proliferación de células mixomatosas y una infiltración inflamatoria a base de eosinófilos.

El epitelio externo del escroto presentaba inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas y degeneración vacuolar moderadas, la dermis tenía un severo edema, algunas células sincitiales, leve proliferación de células mixomatosas y una infiltración de eosinófilos también leve. En la región de las túnicas se encontró un leve infiltrado difuso de eosinófilos.

El parénquima testicular presentaba una fibrosis producto de algún proceso patológico anterior y en la túnica vaginal visceral se observó una infiltración de eosinófilos y un edema leves.

El epitelio de la piel del prepucio y de los folículos pilosos manifiestaba inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas y degeneración vacuolar moderadas; en la dermis se observó en forma leve, edema, proliferación de células mixomatosas e infiltración difusa de eosinófilos. Tanto el epitelio externo del pene como el interno del prepucio presentaron inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas en forma moderada y degeneración vacuolar leve. En la uretra se hallaron inclusiones y degeneración vacuolar moderadas, así como un infiltrado inflamatorio de eosinófilos leve; la submucosa uretral presentó un leve edema, leve proliferación de células mixomatosas y una infiltración de eosinófilos también leve.

**Animal N° 5:** En la histopatología del párpado se observó en el epitelio interno una degeneración vacuolar severa con formación de pápulas, además una moderada infiltración de eosinófilos en forma de microabscesos y en las células epiteliales la presencia de inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas en forma leve. La submucosa mostraba edema moderado, leve proliferación de células mixomatosas e infiltración difusa leve de eosinófilos, en el tejido glandular habían también inclusiones y degeneración vacuolar pero en forma leve. El epitelio externo presentaba también una degeneración vacuolar severa acompañada de vesículas y úlceras, así como por la presencia de inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas en forma leve. Tanto la degeneración vacuolar como las inclusiones también se encontraron en el epitelio de los folículos pilosos. Las lesiones de la dermis son las mismas descritas para la submucosa del epitelio interno del párpado.

En el epitelio nasal y de los folículos pilosos de la nariz también se presentó una vacuolización severa con formación de vesículas y una cantidad moderada de inclusiones. La dermis manifiestaba un edema moderado, congestión vascular y aquí tanto la proliferación de células mixomatosas como la infiltración inflamatoria por eosinófilos eran moderadas.

En la oreja el epitelio mostraba una degeneración vacuolar leve y escasas inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas. En la dermis existía un leve edema, células mixomatosas escasas y no se observaron células inflamatorias.

El escroto presentaba una degeneración vacuolar y una cantidad moderada de inclusiones en el epitelio, en estas inclusiones fue posible observar una estructura cocoide central cuyo aspecto era basófilo. En la dermis había un leve edema y presencia escasa de células mixomatosas e inflamatorias.

En el cuadro N° 3 están resumidos estos hallazgos, para eso se presenta como ejemplo el tejido de los párpados, que es uno de los más frecuentemente afectados por la enfermedad y que fue uno de los que presentaron lesiones en todos los casos estudiados. La degeneración vacuolar e inclusiones en el epitelio, así como el edema, el infiltrado inflamatorio y las células mixomatosas en la submucosa fueron lesiones encontradas en los cinco animales analizados y pueden observarse en las figuras número 3, 4 y 5. Se presentaron vesículas en el epitelio en 4 de esos animales y úlceras en 3. La hiperplasia del epitelio y la presencia de microabscesos en la submucosa se registraron cada una en uno solo de los casos.

Por ser los nódulos generalizados una lesión encontrada solamente en uno de los casos, se quiso destacar el carácter mixomatoso de la misma por medio del cuadro N° 4, el cual resume los hallazgos histopatológicos que la caracterizan.

La distribución geográfica de la procedencia de los animales de origen conocido que formaron parte de los estudios retrospectivo y prospectivo, está ilustrada en la figura N° 8 que se encuentra en el anexo (página N° 100).

Cuadro No. 3: Lesiones microscópicas de los párpados características de la Mixomatosis encontradas en el estudio prospectivo.

Animal No.	1	2	3	4	5
<b>Lesión:</b>					
Degeneración vacuolar del ep. int.	+	++	+++	++	+++
Degeneración vacuolar del ep. ext.	-	+	++	+++	+++
Inclusiones en el ep. int.	(+)	++	+	++	+
Inclusiones en el ep. ext.	-	+	+	+	+
Hiperplasia del ep. int.	-	+	-	-	-
Hiperplasia del ep. ext.	-	+	-	-	-
Vesículas en el ep. int.	-	++	-	++	-
Vesículas en el ep. ext.	-	+	++	+++	+++
Úlceras en el ep. int.	-	-	+++	-	-
Úlceras en el ep. ext.	-	-	++	+++	+++
Células inflamatorias en la submucosa del ep. int.	+	++	+	++	+
Células inflamatorias en la dermis del ep. ext.	-	-	+	++	+
Microabscesos en la submucosa del ep. int.	-	++	-	-	-
Microabscesos en la dermis del ep. ext.	-	-	-	-	-
Edema en la submucosa del ep. int.	++	++	+++	+++	++
Edema en la dermis del ep. ext.	-	+	+	-	++
Células mixomatosas en la submucosa del ep. int.	+	++	+	+	+
Células mixomatosas en la dermis del ep. ext.	-	(+)	+	+	+

ep. int. epitelio interno  
 ep. ext. epitelio externo  
 - ausente  
 (+) escasa  
 + leve  
 ++ moderada  
 +++ severa



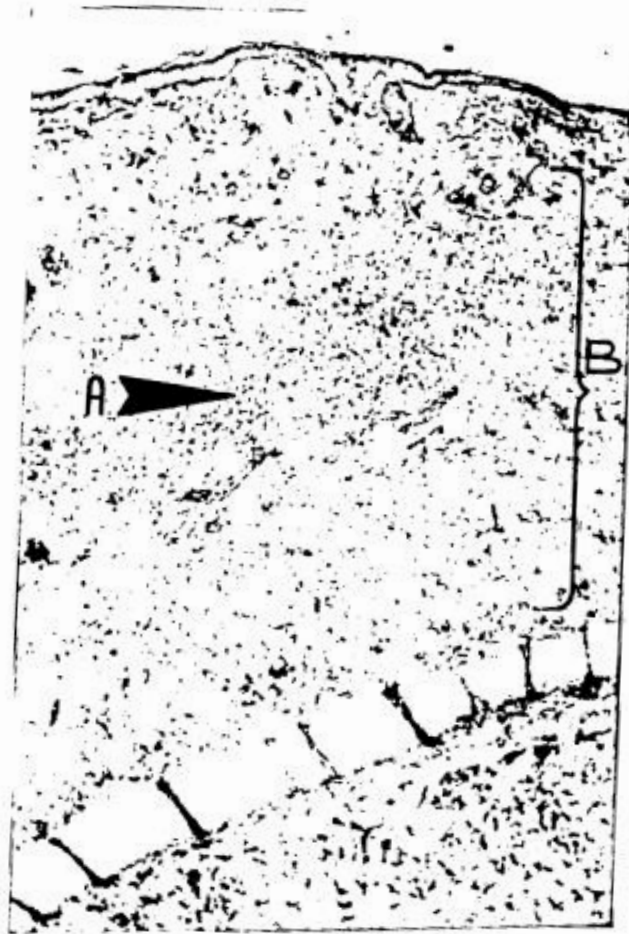


Figura Nº 3: Pabellón auricular. Se observa: A) Proliferación de células mixomatosas. B) Edema. (Aumento 4X)

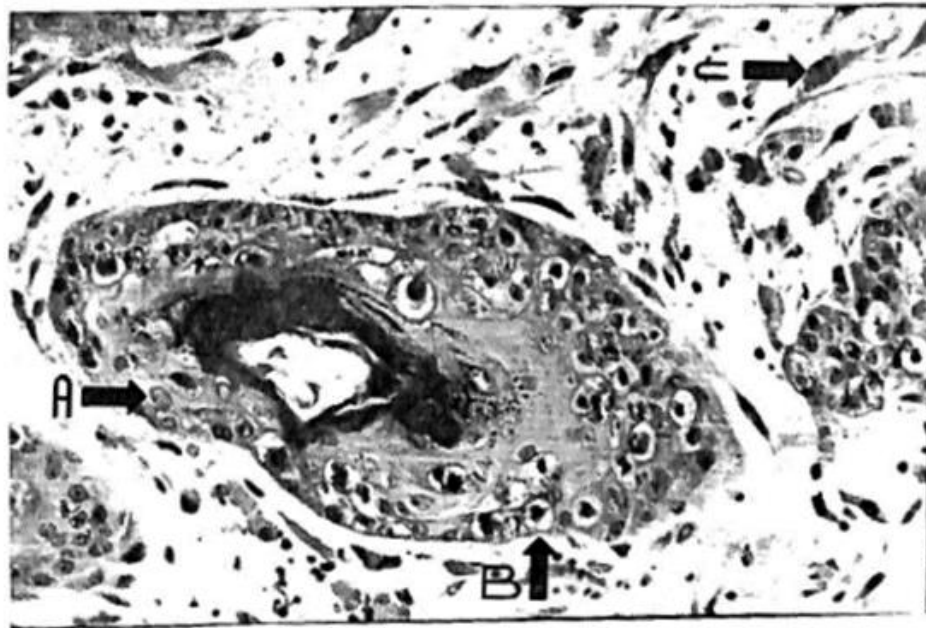


Figura No 4: Folículo piloso de la nariz. Se observa: A) Células epiteliales normales. B) Células epiteliales con inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas. C) Células mixomatosas estrelladas en la dermis. (Aumento 25X).

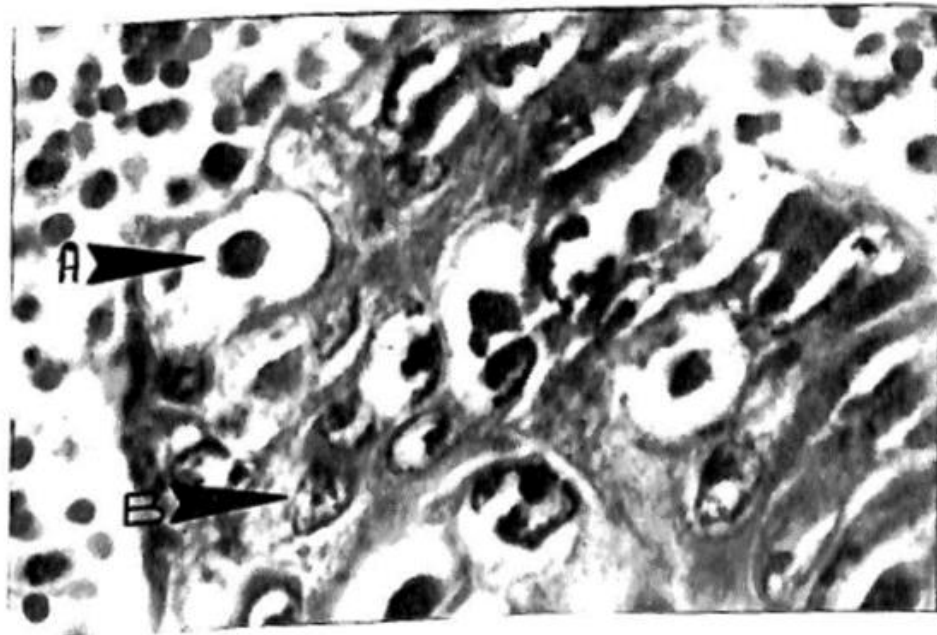


Figura No 5: Epitelio de la piel. Se observan células epiteliales mostrando inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas (A). Nótese cerca de ellas algunas células que no presentan alteraciones (B). (Aumento 100X)

Cuadro No. 4: Lesiones microscópicas más importantes en los mixomas generalizados en la piel del animal No. 2

Lesión	Severidad
Degeneración vacuolar del epitelio	++
Inclusiones en el epitelio	++
Edema en la dermis	++
Proliferación de células mixomatosas en la dermis	+
Infiltración de células inflamatorias en la dermis	-

- ausente  
+ leve  
++ moderada

#### 2.4) Diagnóstico etiológico por medio del aislamiento viral:

##### 2.4.1) Determinación del efecto citopático:

El efecto citopático se encontró en las muestras de los animales número 1, 3 y 4. Este efecto se caracterizó por el englobamiento y lisis que sufrieron las células, así como por el desprendimiento de la monocapa en forma focal.

El animal número 2 no presentó el efecto en ninguno de los 3 pasajes realizados.

Por otra parte del animal número 5 no se procesaron muestras para virología debido a que los tejidos se perdieron, pues el congelador donde estaban conservados sufrió un desperfecto.

En los cultivos control no presentó el efecto citopático.

##### 2.4.2) Observación e identificación del virus por microscopía electrónica:

La confirmación definitiva del diagnóstico de los casos que presentaron efecto citopático en el cultivo celular se realizó mediante microscopía electrónica de los sobrenadantes de esos cultivos.

Se observaron tanto partículas virales inmaduras como maduras. Las primeras presentaban áreas de condensación interna y eran esféricas, en las segundas se observó una envoltura bien definida formada por estructuras tubulares dispuestas al azar, los viriones maduros eran de forma ovoide y midieron aproximadamente 250 nm de ancho por 300 nm de longitud.

En las figuras número 6 y 7 se puede apreciar la morfología de las partículas virales encontradas.

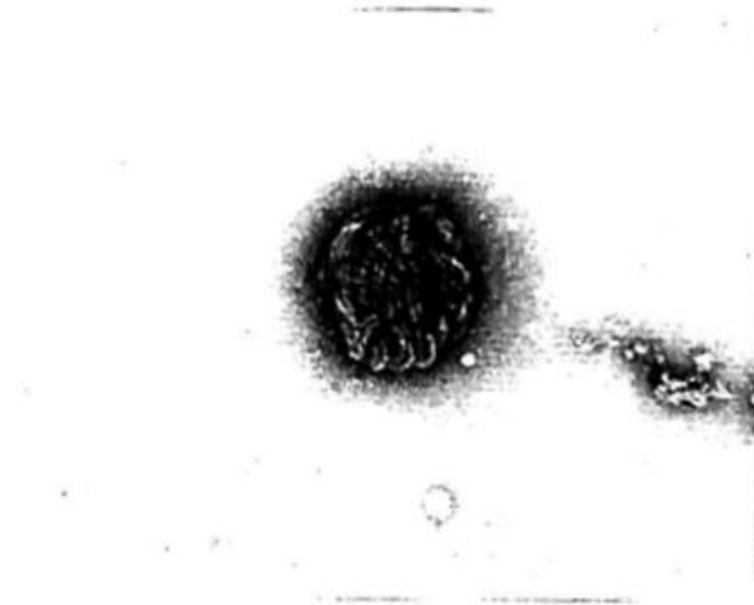


Figura N<sup>o</sup> 6: Virus de la Mixomatosis. (Aumento 100000X).

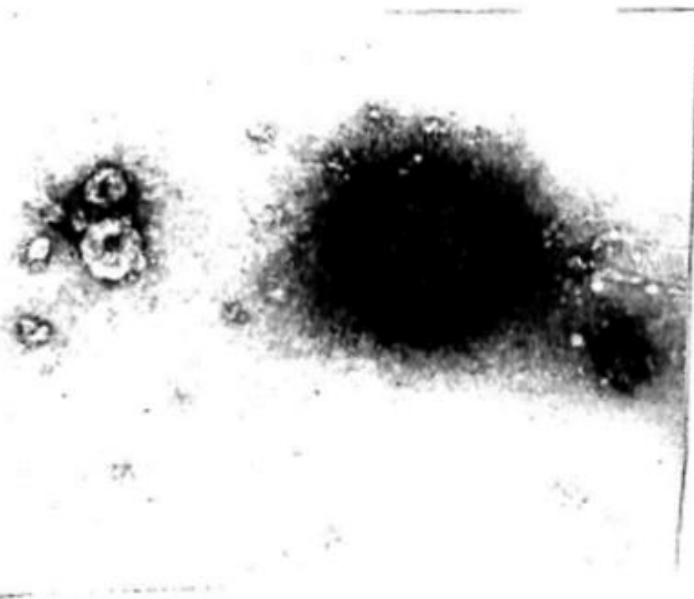


Figura N<sup>o</sup> 7: Virus de la Mixomatosis. (Aumento 100000X).

## Discusión

### 1) Estudio retrospectivo:

#### 1.1) Recopilación de los casos de mixomatosis:

La finalidad del estudio retrospectivo del archivo del Laboratorio de Patología era buscar datos bien documentados sobre posibles casos de mixomatosis presentados en Costa Rica antes del inicio del estudio prospectivo. Este objetivo se cumplió y se determinó además que la proporción de conejos cuyo diagnóstico de fue mixomatosis es de un 10.7%, del total de conejos a los que el laboratorio realizó necropsia en el período 1976-1992. Sin embargo, este porcentaje no puede considerarse como una referencia de la prevalencia de la enfermedad en el país en ese período de tiempo, por el hecho de que no es una muestra estadísticamente diseñada para ser representativa de alguna población.

#### 1.2) Estudio histopatológico:

Dado que el virus tiene tropismo por los epitelios (8), era de esperarse que las lesiones epiteliales fueran la constante en todos los casos.

La degeneración vacuolar aparece en algunos de los casos evolucionada hacia la formación de vesículas, pápulas o úlceras y se origina según Dos Santos (1982) en una degeneración hidrópica

que sufren las células del epitelio. Posiblemente la no observación de la degeneración en la forma hidrópica se debe a que cuando los animales fueron llevados a la necropsia ya esta etapa había pasado. La degeneración observada cobra mayor importancia diagnóstica al asociarse en todos los casos a la presencia de inclusiones en el epitelio, las cuales son características de las infecciones poxvirales (8).

El edema del corion y el infiltrado celular inflamatorio son otras de las alteraciones que contribuyen a la formación de los típicos mixomas. Aunque estas lesiones por sí solas no caracterizarían el cuadro, por ser en general parte del proceso de la inflamación, asociadas al resto de las lesiones mencionadas, contribuyen a enmarcarlo en la descripción dada por la literatura para la degeneración mixomatosa (7).

Según la revisión efectuada en los tejidos, es evidente que el aspecto grande y estrellado, así como la localización de las células mixomatosas en la dermis coincide con lo que está descrito en la literatura (8,22,28,45), lo cual permitió identificar estas células como tales y además catalogarlas como mixomatosas en la descripción de los hallazgos histopatológicos.

Otras lesiones encontradas que no tuvieron una manifestación tan frecuente como las anteriores, fueron la hiperplasia del epitelio y la presencia de mucina o ácido hialurónico en la dermis. Ambas no tienen un respaldo tan sólido en la literatura como las cuatro mencionadas anteriormente; así pues, el aumento en el número de células epiteliales es indicado por unos autores (22) pero



desmentido por otros (12), mientras que la presencia de mucina es solo mencionada por un autor (45) y la de ácido hialurónico solo por otro (28) dentro de la literatura consultada y no como una condición siempre presente. Aun así, su presencia no debe de dejar de considerarse como indicativa de la enfermedad y su ausencia tampoco puede suprimir la importancia de los otros hallazgos ya mencionados.

Por todo lo expuesto anteriormente después de la revisión hecha a los tejidos de los casos de archivo, logramos corroborar los diagnósticos de mixomatosis hechos en su oportunidad por los patólogos en cada uno de estos casos.

## **2) Estudio prospectivo:**

### **2.1) Obtención de los animales:**

Debido a que esta es una investigación de carácter preliminar sobre el diagnóstico de laboratorio de una enfermedad poco estudiada en Costa Rica, no se utilizó un método estadístico de muestreo para obtener los animales objeto del estudio prospectivo. Por lo anterior, estos animales no deben considerarse como una muestra que tenga algún valor estadísticamente representativo sobre la situación de la mixomatosis en el país. Esa naturaleza preliminar del estudio es la razón por la cual el análisis de los

casos no fue profundizado desde la perspectiva clínica y epidemiológica, sino que se concentró básicamente en el diagnóstico de laboratorio.

## **2.2) Estudio anatomopatológico:**

Los mixomas son lesiones muy características de la enfermedad que permiten usualmente hacer un diagnóstico clínico bastante acertado de la misma y su localización en los casos estudiados coincide con la que la literatura señala para la forma clásica (2,25,45). La existencia de lesiones concomitantes (blefaritis purulenta, rinitis purulenta y hemorragias en los párpados) depende de la evolución de la enfermedad (2), hecho que explica las variaciones en su aparición en los diferentes animales a los que se realizó la necropsia. El aumento de tamaño de los linfonodos de la cabeza, aunque se encontró solamente en uno de los casos, está descrito en la literatura (22,28).

## **2.3) Estudio histopatológico:**

En cuanto al aspecto cualitativo de las lesiones encontradas, los comentarios hechos con respecto al valor diagnóstico de las lesiones de los casos del estudio retrospectivo y su relación con las descripciones que la literatura hace para la mixomatosis, pueden aplicarse, en términos generales a las alteraciones encontradas en los casos del estudio prospectivo. Esto por cuanto

las lesiones que se presentaron en el 100% de los primeros también aparecieron en la totalidad de los segundos. Además la existencia de células mixomatosas, encontrada en casi todos los casos de archivo analizados por histopatología (13 de 14), se observó también en todos los casos nuevos. Al igual que en los casos del estudio retrospectivo, el resto de las lesiones halladas durante el estudio prospectivo no tuvieron una presencia tan constante.

Para las alteraciones encontradas durante el estudio histopatológico de los casos nuevos, resulta difícil hacer comentarios relacionados con el aspecto cuantitativo, por cuanto el grado de severidad de las mismas en los diversos tejidos en cada uno de los casos analizados, depende de múltiples variables que están fuera de nuestro conocimiento. Tales variables son: el tiempo transcurrido desde el inicio de la enfermedad, la virulencia del agente, el estado inmunológico del hospedero, su resistencia genética a la enfermedad y el grado de exposición a agentes bacterianos que producen infecciones secundarias (2,12,25).

El cuadro N°4 contiene algunas de las alteraciones histopatológicas encontradas en las lesiones cutáneas generalizadas que presentaba el animal número 2, las cuales coinciden ampliamente con la descripción que en la literatura se hace para la degeneración mixomatosa (2,7,8,22,25,28,45). Con esto es posible despejar eventuales dudas sobre el diagnóstico en el caso particular de este animal, pues recordemos que fue el único de los casos estudiados que mostró un cuadro generalizado de mixomatosis y que resultó negativo en el aislamiento viral.

Para finalizar la discusión de los resultados de esta investigación en el área de patología, consideramos importante comentar dos factores. El primero es que en la revisión bibliográfica realizada no se encontraron datos sobre las formas en que la mixomatosis se ha presentado en Costa Rica y por esta razón, es posible que las manifestaciones que se den en el país tengan diferencias clínicas o patológicas con respecto a la descripción que esa literatura brinda; y el segundo es que aun presentándose la enfermedad en el país bajo las formas que la literatura describe, no siempre los casos de campo de una enfermedad se ajustan completamente a lo que se señala en esas fuentes. No obstante, valorando los resultados de este estudio y comparándolos con la descripción bibliográfica, consideramos que se puede emitir un diagnóstico anatomo e histopatológico de la mixomatosis bien fundamentado.

#### **2.4) Diagnóstico etiológico por medio del aislamiento viral:**

##### **2.4.1) Determinación del efecto citopático:**

Las características del efecto citopático encontrado en los aislamientos positivos coinciden con las que señala la literatura para la mixomatosis (9,49).

A pesar de que las lesiones anatomo e histopatológicas del animal número 2 son las de un conejo con mixomatosis, el aislamiento del virus a partir de éste no fue posible. La razón de

esto no está muy clara y es probable que por la evolución de la enfermedad en ese animal, el título del virus en los tejidos aportados como muestra no fuera lo suficientemente alto como para lograr el aislamiento; o bien que como esas muestras fueron tomadas 12 horas postmortem la capacidad de replicación viral se halla visto afectada. De todas maneras si éste fuera el caso, posiblemente el título del virus era bajo en el animal enfermo pues algunas fuentes bibliográficas señalan que el agente sobrevive mucho tiempo postmortem en el animal (25,28). Considerando la posibilidad de que el cuadro observado no halla sido causado por el Virus de la Mixomatosis, debemos tener en cuenta que en un conejo con el cuadro que presentó el que nos ocupa, casi todos los diagnósticos diferenciales pueden ser descartados y la única enfermedad con que podría confundirse es la fibromatosis, pero ésta prácticamente es asintomática en conejos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) adultos y el cuadro clínico que produce es propio del conejo silvestre americano (*Sylvilagus spp*) (2,28). Por otro lado, el Virus del Fibroma de Shope solamente ataca al conejo doméstico adulto si éste está inmunosuprimido (2), de lo cual no se encontró evidencia en este animal.

#### **2.4.2) Observación e identificación del virus por microscopía electrónica:**

La confirmación definitiva del diagnóstico se logró observando el agente involucrado por medio de microscopía electrónica,

utilizando para ello los sobrenadantes de los cultivos celulares que presentaron efecto citopático. Las características morfológicas de las partículas virales encontradas están detalladas en la sección de resultados y coinciden ampliamente con las descripciones e ilustraciones que la literatura consigna para el Virus de la Mixomatosis (9,29).

De acuerdo a las fuentes oficiales consultadas en el MAG esta es la primera vez que este virus es aislado en el país.

### Conclusiones

Con base en el estudio retrospectivo realizado en el Laboratorio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria mediante la revisión de los tejidos de los casos contemplados en ese estudio, cuyo diagnóstico de patología fue mixomatosis, se concluye que hay evidencia histopatológica de la existencia de esta enfermedad en Costa Rica desde el año 1977 y que durante el período de 1976 a 1992 ese laboratorio emitió este diagnóstico para 15 conejos, constituyendo ésto el 10,7% de la totalidad de animales de esta especie sometidos a necropsia en esos años.

Al hacer una comparación de las lesiones encontradas en los casos de archivo con las de los casos del estudio prospectivo, es evidente que hay gran semejanza en cuanto a la localización de las mismas y a sus características histopatológicas, tanto que encontramos una serie de lesiones que existen en común en todos los animales de ambos grupos. Estas lesiones están ampliamente descritas para la forma clásica de mixomatosis en la literatura. También es importante el hallazgo de otras lesiones, que aunque sólo se presentaron en algunos de los casos, también son características de la enfermedad según las fuentes consultadas.

El efecto citopático encontrado en 3 de los 4 cultivos celulares en los que se intentó el aislamiento viral, se debe a la acción del agente sobre las células. Esto se pudo demostrar por la ausencia de dicho efecto en los cultivos control y además por la detección del virus por medio de microscopía electrónica. Este

efecto tal y como se presentó en el transcurso de esta investigación también está debidamente descrito para la mixomatosis en la literatura.

El hecho de que por primera vez en Costa Rica se observe el agente, se identifique por sus características morfológicas y se fotografíe por microscopía electrónica, constituye una confirmación documentada de la existencia del Virus de la Mixomatosis en este país y en consecuencia, es hasta ahora, que se hace el diagnóstico etiológico de la mixomatosis en Costa Rica.



### Recomendaciones

Al estar documentada la existencia del Virus de la Mixomatosis en Costa Rica es importante que el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) y demás autoridades zoonosanitarias del país incorporen los resultados de esta investigación en sus políticas específicas de control esta enfermedad.

Consideramos de especial relevancia que el MAG haga del conocimiento de los organismos internacionales relacionados con la salud animal los resultados de este estudio preliminar sobre la mixomatosis en Costa Rica.

No obstante que los procedimientos utilizados durante la realización de esta investigación han estado orientados al desarrollo del diagnóstico de laboratorio de la mixomatosis, con miras a documentar la presencia del agente en el país; pueden constituir un medio de diagnóstico de la enfermedad a ser utilizado de rutina.

A nivel de campo es importante valorar las características clínicas, epizootiológicas y de necropsia, las cuales son por lo menos para la forma clásica de la enfermedad, elementos muy típicos que permiten conseguir un diagnóstico clínico acertado.

Se recomienda realizar estudios posteriores que aborden aspectos como la caracterización de las cepas del virus, las formas clínicas de manifestación de la enfermedad y su situación epizootiológica en el país; lo anterior por cuanto en el carácter preliminar de esta investigación, concentrada en el área de

diagnóstico, no estuvo contemplado el desarrollo de estos temas.

Consideramos conveniente que la Dirección General de Estadística y Censos tome en cuenta a los conejos domésticos al hacer su próximo censo para así facilitar investigaciones posteriores, porque si se quisiera establecer la prevalencia de la enfermedad en Costa Rica, existiría la limitante de que determinar una muestra estadísticamente representativa de la población de conejos domésticos probablemente sea difícil, entre otras razones por el hecho de que en el último censo agropecuario realizado en el país en 1984, no se tomó en cuenta a esta especie y por lo tanto se ignoran las características de la población.

Es necesario valorar el alto porcentaje de mortalidad y el poco tiempo que, según algunos autores, permanece la inmunidad humoral en los sobrevivientes, como factores que dificultarían la realización de estudios serológicos para determinar la prevalencia de la mixomatosis en Costa Rica.

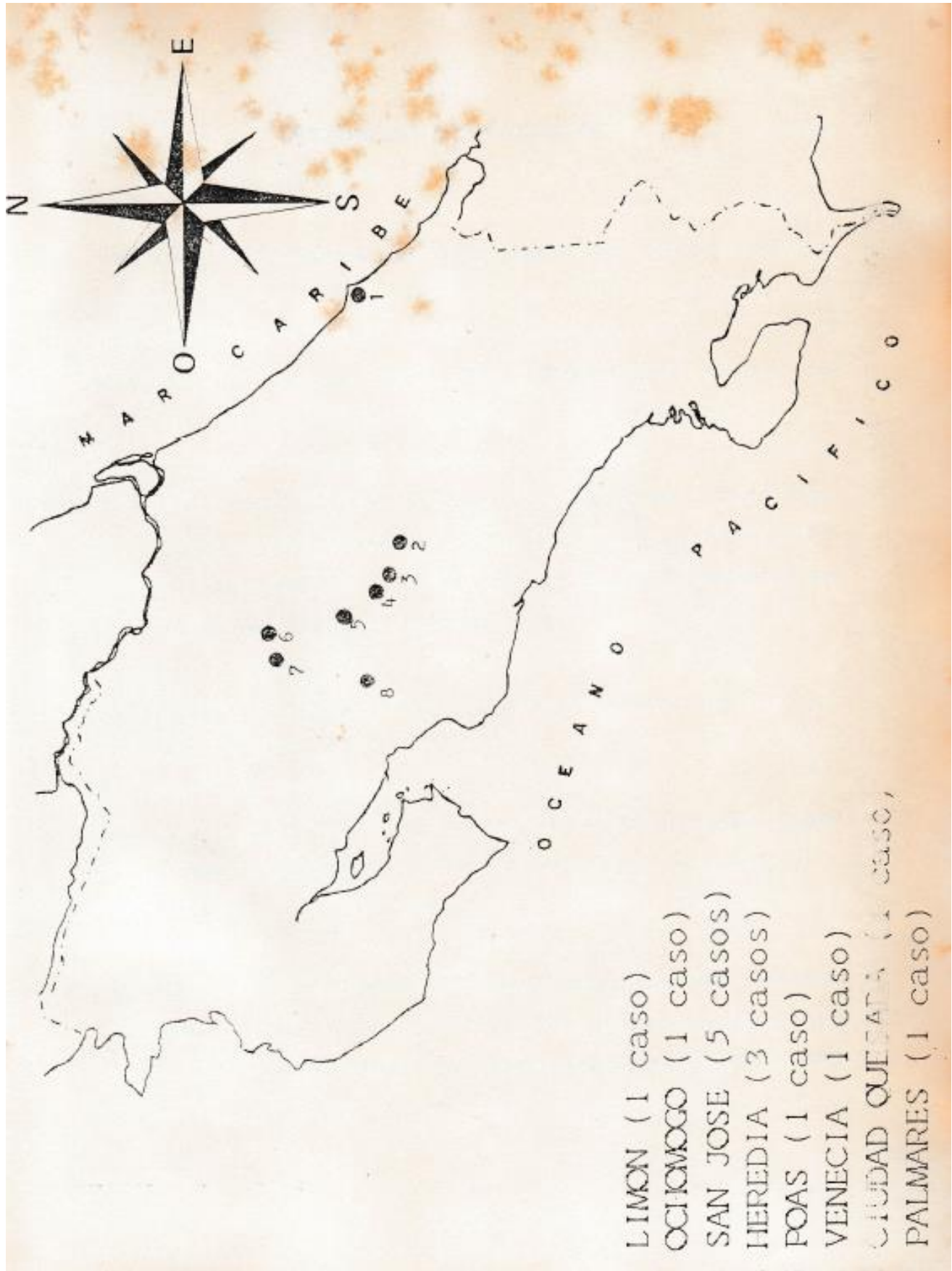
La profilaxis sanitaria, como parte de la prevención de la mixomatosis, puede ser libremente utilizada por quien tenga interés en evitar el contacto del virus con los animales susceptibles. La profilaxis médica o vacunación (inmunoprofilaxis) no está disponible en el país y no será hasta que se realicen otros estudios sobre la enfermedad y hasta que las autoridades zosanitarias correspondientes hagan la valoraciones del caso, que se adopte la resolución adecuada en cuanto a su utilización. Las recomendaciones específicas sobre ambas formas de profilaxis pueden encontrarse entre las páginas 39 y 45 de este trabajo en el ítem de

prevención en la revisión bibliográfica sobre la mixomatosis que está en la primera parte de este trabajo.

Por último y con el fin de lograr el máximo beneficio para nuestra sociedad, instamos a las instituciones públicas y privadas que realicen estudios sobre enfermedades poco investigadas en el país, a comunicar sus resultados al MAG, principalmente si se trata de enfermedades que como la mixomatosis son por ley de denuncia obligatoria.

100

ANEXO



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) BATLLORI, P.C. **Cunicultura**. 2ed., Barcelona : Aedos. p.p. 11-12. 1974.
- 2) BRUGUERE, P.J. Myxomatosis. **Selezione Veterinaria**. 33 (7) : 35-45. Jul. 1992.
- 3) BRUN, A., PRECAUSTA, P. et TERRE, J. Etude de l'administration par voie intradermique du Virus de Shope dans la prophylaxie medicale de la myxomatose. **Revue de Médecine Vétérinaire**. 129 (6) : 887-893. Jun. 1978.
- 4) CHEVILLE, N.F. **Cytopathology in Viral Diseases**. Basel : Karger. p.p. 15. 1975.
- 5) DE DIEGO, A.I. **Guía para el Estudio de las Enfermedades Infecciosas de los Animales (Aves y Mamíferos)**. Buenos Aires : Farro. p.p. 434-435. 1974.
- 6) DEUTRICH, V.V. und HAUSBURG, G. Impfstoffeinsatz zur Myxomatosebekämpfung auf der Grundlage der epizootiologischen Rayonierung. **Monatshefte für Veterinärmedizin**. 41 (18) : 615-621. Jan. 1986.

- 7) DOS SANTOS, J.A. **Patología Especial de los Animales Domésticos**. México, D.F. : Interamericana. p.p. 671-673. 1982.
- 8) DUCLOS, P., TUALLION, P. et JOUBERT, L. Histopathologie de la atteinte cutané-muqueuse et pulmonaire de la myxomatose. **Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France**. 56 : 95-104. 1983.
- 9) FAIN-BINDA, J.C., COMBA, F., LAURIA, D. et al. Mixomatosis. Aislamiento de Leporipoxvirus de conejos en Rosario. **Revista Veterinaria (Argentina)**. 67 (1) : 38-42. Mar. 1986.
- 10) FARCHMIN, G. **Inspección Veterinaria de los Alimentos**. Zaragoza : Acribia. p.p. 253. 1967.
- 11) FENNER, F., BACHMANN, P.A., GIBBSS, E.P.J. et al. **Veterinary Virology**. London : Academic. p.p. 21-24, 29, 388-391, 401-403. 1987.
- 12) FENNER, F., Mc. AUSLAN, B.R., MIMS, C.A. et al. **The Biology of Animal Viruses**. 2ed., New York, USA : Academic. p.p. 19, 348, 365-366, 370, 412, 480, 588-592, 619-627. 1974.
- 13) FENNER, F. and RATCLIFFE, F. **Myxomatosis**. Cambridge, USA : Cambridge University Press. 1964.

- 14) FERRER, J y VALLE, J. **El Arte de Criar Conejos y Otros Animales de Peletería**. 7ed., Barcelona : Aedos. p.p. 13-16. 1976.
- 15) FLUX, J.E.C. Ecological reasons for not introducing myxomatosis. **New Zealand Veterinary Journal**. 34 : 51-52. Mar. 1986.
- 16) Food and Agriculture Organization of the United Nations, Office International des Epizooties, World Health Organization. **Anuario de Sanidad Animal 1992**. Roma : FAO. p.p. 57. 1993.
- 17) GISBER, A.L. **Cría del Conejo de Angora**. Buenos Aires : Albatros. p.p. 9-12. 1974.
- 18) GRUMBRELL, R.C. The Association rabbit control and myxomatosis. **New Zealand Veterinary Journal**. 34 : 21. Mar. 1986.
- 19) \_\_\_\_\_. Myxomatosis and rabbit control in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**. 34 : 54-55. Mar. 1986.
- 20) HARWOOD, R.F. y JAMES, M.T. **Entomología Médica y Veterinaria**. México, D.F. : Limusa. p.p. 266-267, 380-381. 1987.
- 21) HIME, J.M. y O DONOGUE, P.N. **Patología de los Animales de Laboratorio : Diagnóstico y Tratamiento**. Zaragoza : Acribia. p.p. 35-45. 1985.



- 22) HUNT, R.D., CARTON, W.W. and KING, N.W.Jr. *Viral Diseases*, In: **Pathology of Laboratory Animals**. (Benirschke, K. Ed.) New York, USA : Springer-Verlag. p.p. 1349-1351. 1978. v.2.
- 23) JOPP, A.J. *Myxomatosis*. **New Zealand Veterinary Journal**. 34 : 52- 54. Mar. 1986.
- 24) JOUBERT, L. et MONNET, P. *Verification experimentale du role des simules dans la transmission du virus myxomateaux en Haute-Provence*. **Revue de Médecine Vétérinaire**. 126 (5) : 617-634. May. 1975.
- 25) KOTSCHE, W. y GOTTSCHALK, C. *Enfermedades del Conejo y la Liebre*. Zaragoza : Acribia. p.p. 35-45. 1974.
- 26) LEBAS, F., COUDERT, P., ROUVIER, R. et al. *El Conejo: Cría y Patología*. Roma : FAO. p.p. 158-159. 1986.
- 27) *El Manual Merck de Veterinaria*. 3ed., Madrid : Centrum. p.p. 1142-1143. 1988.
- 28) MASCARO, L.A. *Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos (Epizootiología, Inmunología, Profilaxis y Terapéutica)*. Buenos Aires : Albatros. p.p. 217-220. 1975.

- 29) MERCHANT, I.A. y PACKER, R.A. **Bacteriología y Virología Veterinarias**. 3ed., Zaragoza : Acribia. p.p. 638-639. 1975.
- 30) Ministerio de Economía, Industria y Comercio. Dirección General de Estadística y Censos. **Censo Agropecuario 1984**. San José : Nacional. p. 216. 1987.
- 31) MOHANTY, S.B. and DUTTA, S.K. **Virología Veterinaria**. México, D.F. : Interamericana. p.p. 313-314. 1988.
- 32) Office International des Epizooties. **Código Zoosanitario Internacional (mamíferos, aves y abejas)**. París : OIE. p.p. 393. 1992.
- 33) Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, Banco Interamericano de Desarrollo. **Cuarentena Animal: Enfermedades Cuarentenables**. Washington, USA : OPS. p.p. 274-275. 1986. v.1.
- 34) PARKIN, R.J., JONES, D.R. y FROST, B.St.J. **Producción Moderna de Conejos**. Zaragoza : Acribia. p.p. 1. 1972.
- 35) PITTAWAY, A.R. **Arthropods of Medical and Veterinary Importance: A checklist of preferred names and allied terms**. Oxford : CAB International. p.p. 1-152. 1991.

- 36) Pulgas Salvavidas. **La Nación**, San José, agosto, 19, 1993 : 2 Viva.
- 37) Reglamento de Defensa Sanitaria Animal. **La Gaceta**, San José, Junio, 24, 1983 : 1-13.
- 38) Reglamento para la Evaluación y Aprobación de Productos y/o Subproductos de Origen Animal Importados por Costa Rica. **La Gaceta**, San José, Marzo, 11, 1993 : 1-19.
- 39) ROBERTS, A.W. and CARTER, G.R. **Essentials of Veterinary Virology**. Michigan, USA : Michigan State University. p.p. 175-176. 1976.
- 40) SAINZ, P. **El Conejar Moderno**. Barcelona : Sintesis. p.p. 15. 1975.
- 41) SANDFORD, J.C. **El Conejo Doméstico: Biología y Producción**. Zaragoza : Acribia. p.p. 15-18. 1988.
- 42) SOULSBY, E.J.L. **Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos**. México, D.F. : Interamericana. p.p. 218, 369-372, 375, 385-395, 408, 457-474. 1987.
- 43) STORER, T.I., USINGER, R.L., STEBBINS, R.C. et al. **Zoología General**. Barcelona : Omega. p.p. 844-845. 1982.

- 44) TEMPLETON, G.S. **Cría del Conejo Doméstico**. 14ed., México, DF : CECSA. p.p. 15-19. 1976.
- 45) TIMONEY, J.F., GUILLESPIE, J.H., SCOTT, F.W. et al. **Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals**. 8ed., London, United Kingdom : Comstock. p.p. 579-582. 1988.
- 46) TORNOW, V.U. und KOUFFMANN, H. Erfahrungen und Ergebnisse bei der Immunisierung der Hauskaninchen im Rahmen der Myxomatosebekämpfung. **Monatshefte für Veterinärmedizin**. 41 (18) : 621-623. Jan. 1986.
- 47) TOZZINI, F. Activity of alfa 1-4 glucosidase in serum of rabbits affected by myxomatosis. **Archivio Veterinario Italiano**. 26 (5-6) : 199-203. Dic. 1975.
- 48) \_\_\_\_\_. In vitro sensitivity of myxomatosis virus to 6-Azauridine. **Archivio Veterinario Italiano**. 27 (3-4) : 77-78. Aug. 1976.
- 49) TOZZINI, F. e MANI, P. Studio su alcune caratteristiche di crescita del virus della mixomatosi, Ceppo Pisa 73. **Archivio Veterinario Italiano**. 26 (1-2) : 19-25. Abr. 1975.

- 50) WATERSON, A.P. **Introducción a la Virología Animal**. Zaragoza :  
Acribia. p.p. 99-100. 1962.
- 51) WILSON, A. **Inspección Práctica de la Carne**. Zaragoza : Acri-  
bia. p.p. 157. 1970.
- 52) YUILL, T. **Myxomatosis and Fibromatosis**, In: **Infectious Diseases  
of Wild Mammals**. (Davis, E. Ed.) 2ed. Iowa, USA : Iowa State  
University Press. p.p. 154-168. 1981.
- 53) ZELEDON, R. y JIRON, L.F. **Artropodología Médica y Veterinaria**.  
4ed. San José, Costa Rica : Universidad de Costa Rica. p.  
280. 1978.