

Caracterización antigenica de cepas del virus del ectima contagioso (orf), sus interacciones y sus relaciones con parapoxvirus bovinos de México

Sofía González Gallardo*

Andrés Romero Rojas*

Jorge L. Tórtora Pérez*

Eliseo M. Hernández Baumgarten*

Abstract

Thirty-three samples of contagious ecthyma (orf) (19 from goats and 14 from sheep) and 2 strains of bovine parapoxvirus (bovine papular stomatitis and milker's node virus) were antigenically compared by double immunodiffusion (DD) and countercurrent immunoelectrophoresis (CIE). Bovine samples were obtained from a ranch in which the animals cohabited with both sheep and goat flocks. The presence of viral particles was confirmed by electron microscopy in all cases. Suspensions of viral antigens were prepared from infected scabs obtained in different outbreaks of the disease. Tests were performed using a rabbit anti-orf polyclonal serum. The homologous sample produced 3 precipitin lines, the other ones varied between one or two lines or failed in the DD test. Different responses were observed in many cases from DD and CIE tests. Bovine strains formed 2 precipitate lines, one of identity between them and another one with caprine homologous and a sheep orf sample in DD test. The antigenic composition of 15 orf samples (6 sheep and 9 goats) and the 2 bovine strains were examined by electrophoresis, and then seven of them were antigenically evaluated by immunoblotting using the rabbit polyclonal serum. The homologous sample showed 12 proteins, and the rest of the samples showed only 4. The largest electrophoretic variation of the samples was observed between 37 kd and 44 kd proteins. One protein of 55 kd was present in 17 studied samples, another one of 9.5 kd in 13 and another protein of 17 kd in 12, including bovine strains. Immunoblot assay demonstrated antibodies response against 55 kd and 54 kd proteins in the 7 studied samples; 45 and 35 kd were recognized in 5 of the samples. These proteins can explain the cross reactivity between samples in DD and CIE tests, and can play a significant role in immune parapoxvirus recognition too.

Keywords: PARAPOXVIRUS, ORFVIRUS, CONTAGIOSECTHYMA, SOREMOUTH, MILKER'S NODE, BOVINEPAPULARSTOMATITIS.

Resumen

Treinta y tres muestras de costra positivas a ectima contagioso (orf) (19 de caprino y 14 ovinas) y dos de parapoxvirus bovinos (una de estomatitis papular y otra de seudoviruela) fueron analizadas antigenicamente y comparadas por doble inmunodifusión (DD) y contrainmunoelectroforesis (CIE). Las muestras bovinas fueron obtenidas de animales que convivían con rebaños de borregos y cabras. La presencia de partículas virales fue confirmada por microscopía electrónica en todos los casos. Las pruebas fueron corridas usando un suero polyclonal antiectima preparado en conejo. En la prueba de DD la muestra homóloga produjo tres líneas de precipitación, las otras muestras variaron entre dos y una líneas de precipitación y algunas muestras no formaron ninguna, se observaron diferentes resultados con las pruebas de DD y CIE. Las cepas bovinas formaron dos líneas de precipitación, una de identidad entre ellas y otra en identidad con la muestra homóloga de orf caprino y con una de orf ovino, por DD. La composición de 15 muestras de orf (6 ovinas y 9 caprinas) y dos bovinas fueron examinadas por electroforesis, y 7 de ellas evaluadas antigenicamente por inmunotransferencia, usando el suero polyclonal de conejo. La muestra homóloga fue más compleja, pues mostró 12 proteínas. La mayor variación en los corrimientos electroforéticos de las muestras se observó entre las proteínas de los pesos de 37 kd a 44 kd. Una

Recibido el 10 de noviembre de 1998 y aceptado el 13 de agosto de 1999.

* Coordinación de Estudios de Posgrado, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Campo 1, Apartado Postal 222, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.

proteína de 55 kd se identificó en todas las muestras, mientras que una de 9.5 kd se evidenció en 13 muestras y otra de 17 kd en 12, incluyendo las bovinas. Por inmunotransferencia fueron reconocidas dos proteínas comunes en las siete muestras analizadas con pesos de 55 y 54 kd, otras dos proteínas de 45 y 35 kd fueron reconocidas por el suero de conejo en cinco de las muestras. Estas proteínas pueden explicar las reacciones cruzadas observadas entre las muestras, en las pruebas de DD y CIE y ser de importancia en el reconocimiento inmune de estos virus.

Palabras clave: PARAPOXVIRUS, ECTIMA CONTAGIOSO, ORF VIRUS, SEUDOVIRUELA BOVINA, ESTOMATITIS PAPULAR BOVINA.

Introducción

Los parapoxvirus son considerados virus relativamente estables, que primariamente infectan a los rumiantes y mamíferos marinos. El genoma consiste en una molécula de ADN de doble cadena lineal de 70.2 a 148.5 kb, en el que se han demostrado zonas con una extensa hibridación cruzada entre muestras de diferentes miembros del género, así como amplias secuencias de divergencia, que, sin embargo, no coinciden con la reactividad serológica cruzada observada entre los miembros del mismo.^{1,2} El género parapoxvirus está formado por tres virus de interés veterinario: el virus del ectima contagioso u orf (EC) de borregos y cabras, el virus de la estomatitis papular bovina (EPB), y el virus de la seudoviruela bovina o nódulo del ordeñador (PVB).² Las características antigenicas de estos virus pueden ser modificadas por pases en cultivos celulares, sin modificar aparentemente las cualidades fundamentales del ADN.³ Las dificultades e inconsistencias que presentan los parapoxvirus para crecer en cultivos celulares ha dificultado su purificación antigenica por medios convencionales y su uso en pruebas serológicas.^{3,4} Wittek *et al.*,³ aplicando técnicas de neutralización y análisis de ADN, encontraron gran reactividad cruzada entre cepas de EC y EPB y demostraron la existencia de relaciones genómicas entre estos virus.

Los parapoxvirus presentan dos tipos característicos de partículas virales cuando son examinados por tinción negativa con ácido fosfatúngstico pH 7.2 (AFT) en el microscopio electrónico: partículas tipo I o M, las cuales no son permeables al AFT y tienen superficie estriada y las partículas tipo II o C, las cuales son permeables al AFT y en las que se puede apreciar la complejidad de la pared viral y sus estructuras internas, este tipo de partículas son más grandes y de superficie lisa.^{5,6}

El análisis antigenico es una herramienta empleada fundamentalmente para evaluar las posibles relaciones, similitudes y diferencias, entre virus de diferentes orígenes, realizar seguimientos epidemiológicos e incluso inferir parentescos genéticos. En el caso de los parapoxvirus, se ha demostrado por análisis genómico que los tres miembros del género son significativamente diferentes entre ellos, pese a las señaladas relaciones antigenicas y genómicas.⁷⁻⁹ El análisis del ADN

por enzimas de restricción, de muestras de un brote de EC, mostró gran heterogeneidad en los patrones electroforéticos, sugiriendo la coexistencia de diferentes cepas virales en la misma muestra.¹⁰ El mapa genómico de seudoviruela mostró diferencias en los fragmentos de 8 a 22 kb, esta situación sugiere que puede ocurrir una delación natural en estos virus.¹ Sin embargo, Azwai *et al.*,¹¹ al estudiar por inmunotransferencia diferentes muestras de ectima de camello, borrego, cabras y humano, encuentran gran uniformidad entre los diferentes patrones electroforéticos presentados por las cepas, y al examinar la respuesta de anticuerpos IgG e IgM por ELISA encontraron correlación entre el antisuero monoclonal y el policlonal.

En este trabajo, 33 muestras de EC de origen caprino y ovino, una muestra de PVB, otra de EPB y una de avipoxvirus de origen mexicano, fueron examinadas en sus relaciones antigenicas mediante pruebas de doble difusión, contrainmunoelectroforesis, corrimiento electroforético PAGE-SDS, inmunotransferencia e inmunoelectromicroscopia.

Material y métodos

Muestras

Fueron evaluadas 35 muestras de costras, en las que se identificaron partículas virales características de los parapoxvirus, 19 de cabras y 14 de borregos de brotes de EC de diferentes regiones de México, ocurridos entre 1980 y 1989; y dos muestras bovinas, una de estomatitis papular bovina y otra de seudoviruela bovina, obtenidas de la Unidad de Producción de la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, de la Universidad Nacional Autónoma de México, en julio y agosto de 1985, respectivamente, de animales que se encontraban junto a los rebaños de cabras y ovinos. Una muestra de avipoxvirus fue obtenida de un caso de la enfermedad en una paloma. En todos los casos, el diagnóstico fue confirmado por microscopia electrónica usando ácido fosfatúngstico (AFT) pH 7.2.^{5,6}

La muestra utilizada como de referencia fue obtenida de un brote de EC en cabras de Baja California, fue liofilizada mediante la suspensión de 10 g de costra macerada, en 2.5 l de conservador para liofilización de

peptona-sacarosa (fósfato de potasio 2.7 g peptona 20, sacarosa 100 g en 1 000 ml de agua desionizada), la suspensión se fraccionó en unidades de 2 ml y se conservó terminada la liofilización a 4°C. Esta muestra liofilizada fue titulada en células BHK-21, clona 113, y mostró un efecto citopático característico del virus de EC en diluciones hasta de 10⁸, que fue inhibido por suero hiperinmune políclonal contra EC preparado en conejos.¹²

Tratamiento de las muestras

De cada muestra se tomaron 0.3 g que se colocaron en un ml de amortiguador de fosfatos (pH = 7.2) estéril, se incubaron durante 12 h, se homogeneizaron en un mortero tenbroek, se centrifugaron a 1 500 g y el sobrenadante fue tratado con igual volumen de solución saturada de sulfato de amonio para eliminar la contaminación por albúmina,⁶ posteriormente se dializaron con solución salina al 0.85% y se concentraron con azúcar glass.

De la muestra de referencia del virus de EC que había sido previamente caracterizada y liofilizada, se tomaron 15 viales que se resuspendieron en 10 ml de MEM-Eagle, se centrifugaron a 25 000 g durante 60 minutos (Sorval SS-34) y el precipitado fue usado como virus concentrado.

Inmunolectromicroscopía (IEM)

Todas las muestras fueron examinadas en el microscopio electrónico, para evaluar la respuesta de aglutinación y modificación superficial de las partículas virales, en presencia del antisuero de conejo, empleando la técnica descrita por Rosembusch y Ree,¹³ para distinguir serológicamente entre muestras de parapoxvirus de diferente origen. Se mezclaron 0.2 ml de suero políclonal de conejo anti-EC, con 0.2 ml de la muestra viral y se incubaron durante 12 h a 4°C; con una gota de la mezcla incubada se realizó la tinción negativa con AFT a pH = 7.2.

Tinción negativa

Una gota de las suspensiones virales fue adsorbida en dos rejillas previamente preparadas con membrana formvar y contrastadas con solución de AFT al 1%, pH = 7.2, durante 5 minutos, por este método se examinaron las 33 muestras de EC, las dos bovinas (EPB y PVB) y la muestra aviar; asimismo, se corrieron las pruebas de IEM.

Cuantificación de proteínas

El contenido de proteína de los sobrenadantes de las muestras maceradas fue cuantificado usando la técnica descrita por Bradford.¹⁴

Producción de suero hiperinmune anti-EC

Cuatro conejos de la raza Nueva Zelanda, de aproximadamente 2.5 kg de peso, fueron usados para la obtención de suero anti-EC. Estos conejos fueron inoculados subcutáneamente con un ml de la muestra liofilizada de referencia, resuspendida en 3 ml de MEM-Eagle sin suero y sin antibiótico. Después de diez semanas se obtuvo la sangre por punción cardiaca y se evaluó el título de anticuerpos por las técnicas de DDF y CIE.

Doble difusión (DD)

Se utilizó agarosa al 1% en amortiguador de fosfatos (PBS, pH = 8.2), empleando sistemas de seis fosetas periféricas y una central de 5 mm, separadas entre sí por 3 mm, el suero hiperinmune se colocó en el pozo central, las placas fueron incubadas 24-36 h a 4°C, en cámara húmeda con 90% de saturación para prevenir su secado.¹⁵ Por esta técnica fueron evaluadas las 33 muestras de EC, las 2 bovinas (PVB y EPB) y la muestra aviar.

Contrainmunolectroforesis (CIE)

Se les aplicaron 0.065 voltios durante 90 minutos a las placas de agarosa al 1%, preparadas sobre portaobjetos, con perforaciones de 5 mm en paralelo, separadas por 4 mm. Las bandas de precipitación fueron detectadas en DDF y en CIE, usando negro naftol al 1% en ácido acético [(ácido acético/metanol/agua (5:3:2)].¹⁶ Con CIE también se evaluaron las 33 muestras de EC, las 2 bovinas y la aviar.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-Page)

Se prepararon geles al 10% de poliacrilamida y se corrieron a 100 voltios durante tres horas; las bandas de precipitación fueron detectadas por tinción con azul de Coomasie y destenidas con ácido acético/metanol/agua (1:5:4).¹⁷ Para esta prueba fueron seleccionadas en función de los resultados anteriores, cantidad de muestra y de proteína en la misma, 17 muestras: 6 de EC ovino, 9 de EC caprino y las dos bovinas.

Inmunotransferencia

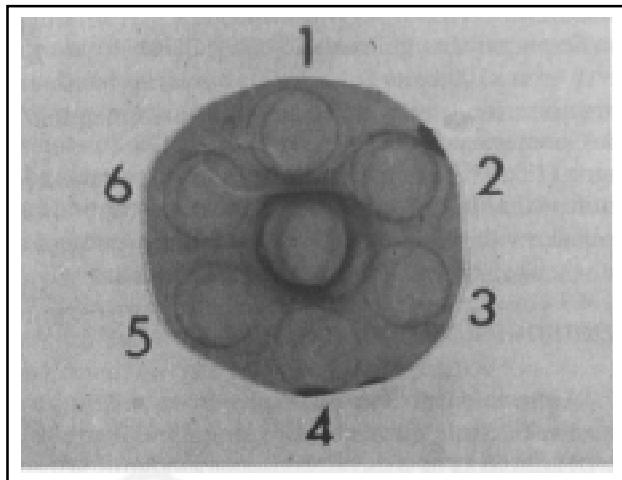
Las proteínas de las muestras separadas por corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida, se transfirieron a papel de nitrocelulosa mediante la técnica descrita por Bowen *et al.*¹⁸ Se empleó el antisuero de conejo anti-EC ajustado a un título de 1:8 a través de las técnicas de CIE y DDF y previamente adsorbido con una costra de cabra de origen. El suero y el papel de nitrocelulosa se dejaron en contacto durante dos horas a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y se

lavó tres veces con amortiguador de fosfatos. Se adicionó el conjugado anticonejo peroxidado y se incubó por dos horas, posteriormente se reveló con la solución reveladora hasta la aparición de las líneas coloradas en el papel de nitrocelulosa.¹⁸ Mediante esta técnica se evaluaron siete muestras seleccionadas con base en las que manifestaron mejor comportamiento electroforético, 4 de EC caprino, incluida la muestra de referencia concentrada y tratada con sulfato de amonio, 1 de EC ovino tratada con sulfato de amonio y la de PVB.

Resultados

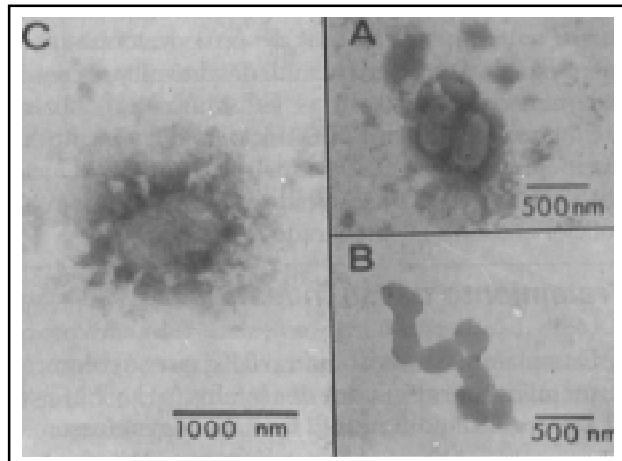
Por medio de las técnicas de DDF y CIE se formaron hasta tres líneas de precipitación con la muestra de EC de referencia purificada y el suero de conejo anti-EC, cinco muestras de EC y la de avipoxvirus no reaccionaron con el suero en ninguna de las dos pruebas. Dos muestras de origen caprino no formaron líneas de precipitación con la técnica de DDF pero sí formaron líneas de precipitación en la CIE. En DDF se evidenciaron dos líneas de precipitación en las muestras bovinas (EPB y PVB), una de identidad entre ellas y la otra con respuesta de identidad con la muestra de referencia y con otra muestra de EC de origen caprino (Figura 1). Siete de las muestras de EC mostraron 2 y 3 líneas de precipitación por DDF y CIE, mientras que 20 muestras sólo manifestaron una línea de precipitación.

Con la prueba de IEM fueron observadas tres formas de partículas virales: partículas virales con envoltura, partículas virales con envoltura y capa y partículas virales desnudas, de acuerdo con las referencias previas para esta prueba.¹³ Esto último se observó incluso en la misma



1 y 4 orf virus caprino de Baja California, México.
2 Virus de estomatitis papular bovina del Estado de México, México.
3 y 5 orf virus de caprino del Estado de México, México.
6 Virus de pseudoviruela bovina del Estado de México, México.

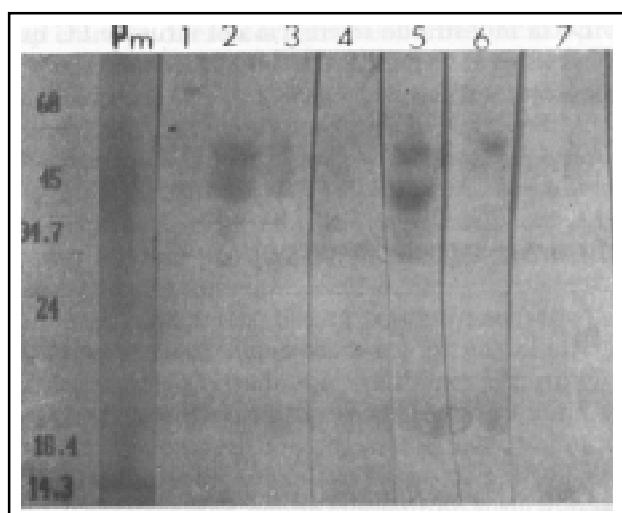
Figura 1. Reacciones antigenicas mostradas entre los parapox por doble difusión. Pozo central suero hiperímmune de conejo antiectima.



A: Partículas de virus de orf con envoltura
B: Partículas de virus de orf desnudas

C: Partículas de virus de orf con envoltura y capa

Figura 2. Inmunoelectromicroscopia por tinción negativa



1. Virus de orf de origen caprino obtenido en Guanajuato, Guanajuato, México, en agosto de 1980.
2. Virus de orf de origen caprino obtenido en Celaya, Guanajuato, México, en diciembre de 1982.
3. Virus de orf de origen caprino obtenido en Zumpango, Estado de México, México, en julio de 1984.
4. Virus de orf de origen ovino obtenido en Huehuetoca, Estado de México, México, en mayo de 1982.
5. Virus de orf de origen caprino obtenido en Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México, en marzo de 1988.
6. Virus de seudoviruela bovina obtenido en Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México, en agosto de 1985.
7. Virus de orf de origen ovino obtenido en Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México, en mayo de 1989.

Figura 3. Inmunotransferencia de muestras de Parapoxvirus, usando un suero anti-orf de conejo.

muestra y aun en el mismo campo de observación en el microscopio electrónico, por lo que no se establecieron distinciones entre las muestras ensayadas (Figura 2).

Los corrimientos electroforéticos permitieron ob-

Cuadro 1

LÍNEAS DE PRECIPITACIÓN OBTENIDAS CON LAS DIFERENTES MUESTRAS DE PARAPOXVIRUS ANALIZADAS CON LAS TÉCNICAS DE DOBLE DIFUSIÓN (DD) Y CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIE), AL SER ENFRENTADAS AL SUERO HIPERINMUNE DE CONEJO

Número de líneas de precipitación	Total de muestras evaluadas	Ovinas	Caprinas	Bovinas
0	DD 7 CIE 11	3 4	4 5	0 2
1	DD 20 CIE 17	5 4	15 13	0 0
2 o 3	DD 7 CIE 5	4 2	1 3	2 0

servar en la muestra de referencia 12 bandas de precipitación; se observó una proteína de 55 kd común a todas las muestras ensayadas, mientras que otra de 9.5 kd se observó en 13 muestras, y una de 17 kd en 12, se observó una mayor heterogeneidad proteínica en la región de 44 a 20 kd.

En inmunotransferencia, usando el suero de conejo anti-EC adsorbido con costra traumática, se observaron respuestas contra proteínas entre 25 y 63 kd, dos proteínas, la de 55 kd y otra de 54 kd, respondieron en todas las muestras, mientras que una de 45 kd y otra de 35 kd presentaron respuesta en cinco de las muestras ensayadas, aunque no fueron las mismas muestras (Figura 3).

Discusión

Aunque las muestras utilizadas en este estudio fueron colectadas entre 1980 y 1989, la demostración de partículas de tipo 1 o M indica que el virus se mantenía infectante en ellas,¹⁰ la resistencia del virus en las costras, ha sido comunicada hasta por más de 15 años a temperatura ambiente.¹⁹ Las pruebas de DD y CIE demostraron la presencia de una a tres bandas de precipitación, contrastando con comunicaciones previas que sólo demostraban una banda de respuesta.^{7,8,12,16,20} Estas variaciones pueden atribuirse a modificaciones en las condiciones en que se corrieron las pruebas en este trabajo, debe insistirse que estas pruebas son apropiadas para demostrar antígeno viral y relaciones antigenicas entre muestras, pero pueden resultar en falsos negativos cuando se pretende demostrar la respuesta serológica en animales convalecientes o posibles portadores del virus.¹² Las respuestas con líneas de identidad de muestras de EC con las muestras bovinas, coincide con anteriores observaciones en este sentido.^{7,8}

Las muestras bovinas, aunque en su diferente presentación clínica, provienen del mismo hato y están fuertemente relacionadas en el tiempo (julio, 1985, EPB, y agosto, 1985, PVB), por lo que incluso podrían considerarse un mismo brote con las dos presentaciones de la enfermedad; sin embargo, demostraron variaciones en las corridas en PAGE. El análisis genómico de los parapoxvirus muestra suficientes variaciones para

mantener separados a los integrantes del género,¹⁻³ pero igualmente demuestra la capacidad del virus para incorporar nuevo material genético, presumiblemente del genoma de las células infectadas, las relaciones antigenicas demostradas para estos virus pueden sugerir una mayor capacidad de variación que la que se les atribuye o bien que las partes menos variables del genoma expresan sus principales antígenos, incluso los reconocidos por la respuesta inmune humoral, explicando así las relaciones serológicas anotadas. Estas relaciones pueden tener valor epidemiológico, en virtud de que se han podido reproducir lesiones en bovinos utilizando virus de brotes de EC⁷ y lesiones en cabras, empleando virus bovino (PVB)²¹ e incluso podrían ser de interés con fines profilácticos empleando virus de diferente origen en las especies heterólogas.

Los patrones electroforéticos de las muestras de EC, mostraron mayor heterogeneidad entre las proteínas de 37 kd y 44 kd; otros autores han encontrado variaciones semejantes en este perfil y consideran que estas proteínas podrían estar localizadas sobre la superficie viral o incluso corresponder al filamento viral que envuelve a las partículas, atribuyéndoles en cualquier caso importancia fundamental en los mecanismos de infección y en la variación de la respuesta inmune del hospedero.²²⁻²⁵ La proteína de 55 kd que estuvo presente en todas las muestras y fue reconocida en las pruebas de inmunotransferencia, podría tener particular interés en términos de las respuestas serológicas cruzadas detectadas y en los mecanismos de reconocimiento inmune de estos virus.

En la inmunotransferencia, el antisuero policlonal de conejo reconoció proteínas entre 25 y 63 kd, coincidiendo con el espectro de mayor heterogeneidad antes señalado, y probablemente lo anterior esté relacionado con la importancia del filamento en la respuesta inmune. McKeever *et al.*²⁵ encontraron que los sueros de borregos infectados natural y experimentalmente, reconocían las proteínas del EC entre 40 y 45 kd, las cuales se consideran como partes del componente mayor del filamento; probablemente la proteína de 55 kd presente en todas las muestras de costra y que reaccionó positivamente contra el suero de conejo anti-EC, estaría en esta situación.

La IEM fue ensayada en todas las muestras y el suero de conejo anti-EC fue usado en todos los casos. Se observaron tres diferentes presentaciones de las partículas virales, partículas con envoltura, partículas sin envoltura, desnudas y partículas con envoltura y capa, tal como ha sido comunicado con anterioridad.¹³ Sin embargo, a diferencia de lo antes señalado,¹³ la técnica no permitió establecer diferencias entre las muestras de distinto origen y estos tipos de presentaciones ocurrieron en todas las muestras en forma mezclada, quizás como consecuencia de las relaciones serológicas de las muestras empleadas en este estudio.

Si se considera que para el caso de los parapoxvirus, las prácticas de profilaxis consisten en la escarificación con virus infectante, aun cuando se emplean productos comerciales (vacunas), los resultados de este trabajo refuerzan lo anterior respecto de la recomendación de no introducir productos del extranjero para tal fin,¹² como consecuencia de la fuerte relación antigenica de los virus nacionales y el riesgo de introducir variantes peligrosas a la ganadería nacional.

Estudios recientes, por otra parte, han demostrado la capacidad de estos virus para incorporar elementos del genoma de la célula infectada, con lo que se pueden explicar las modificaciones antigenicas que sufre el virus al pretender atenuarlo mediante pases múltiples sobre cultivos celulares de especies diferentes a la de origen,³ las fuertes variaciones observadas en el peso de su ADN^{1-3,9} y la diferente virulencia de sus cepas, al ser capaz de incorporar en las porciones terminales, variables, de su genoma, genes moduladores de la inflamación y de la respuesta inmune.²⁶ Esta última condición refuerza la necesidad de insistir en la identificación de posibles antígenos de protección, para clonar y utilizar sus genes en vectores recombinantes.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo en la elaboración del material fotográfico realizado por Rodolfo Robles Gómez y el QFB Jacobo Garibay Escobedo.

Referencias

1. Gassman U, Wyler R, Wittek R. Analysis of parapoxvirus genomes. *Arch Virol* 1985;83:17-31.
2. Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli MA, et al. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York; Springer-Verlag, 1995:84-85.
3. Wittek R, Herlyn M, Schumperli D, Bachman P, Mayr A, Wyler R. Genetic and antigenic heterogeneity of different parapoxvirus strains. *Intervirology* 1980;13:33-41.
4. Nagington J, Whittle C. Human orf. Isolation of the virus by tissue culture. *Br Med J* 1961;2:1324-1327.
5. Nagington J, Newton A, Horne R. The structure of orf virus. *Virology* 1964;23:461-472.
6. Peters D, Müller G, Büttner D. The fine structure of paravaccinia viruses. *Virology* 1964;23:609-611.
7. Huck RA. A paravaccinia virus isolated from cows' teats. *Vet Rec* 1966;78:503-505.
8. Papadopoulos OA, Dawson P, Huck R, Stuart P. Agar gel diffusion studies of paravaccinia viruses. *J Comp Pathol* 1968;78:219-225.
9. Robinson AJ, Barns G, Fraser K, Carpenter E, Mercer AA. Conservation and variation in orf virus genomes. *Virology* 1987;157:13-23.
10. Robinson AJ, Ellis G, Balassu T. The genome of orf virus: restriction endonuclease analysis of viral DNA isolated from lesions of orf in sheep. *Arch Virol* 1982;71:43-55.
11. Azwai SM, Carter SD, Woldehiwet Z. Immune responses of camel (*Camelus dromedarius*) to contagious ecthyma (orf) virus infection. *Vet Microbiol* 1995;47:119-131.
12. Tórtora PJ, García-Jiménez C. Relaciones antigenicas entre diferentes muestras de ectima contagioso (orf) de México. *Téc Pecu Méx* 1987;25:31-40.
13. Rosembusch R, Ree DE. Reaction of convalescent bovine antisera with strain-specific antigens of parapoxvirus. *Am J Vet Res* 1982;44:875-878.
14. Bradford MN. A rapid and sensitive method for the quantitation of microquantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-251.
15. Johnson AM. Immunoprecipitation in gels. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, editors. *Manual of clinical immunology*. 3rd ed. Washington (DC), American Microbiology Soc., 1986:14-24.
16. Puran-Chand VD, Rao VD, Carg SK, Singh IP, Chandra R. Counterimmunoelectrophoresis for rapid diagnosis of sheep pox. *Br Vet J* 1985;141:122-128.
17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 1970;227:680-685.
18. Bowen B, Steinberg J, Laemmli UK, Weintraub H. The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. *Nucl Acids Res* 1980;9:1-21.
19. Hart L, Hayston J, Keast J. Observations on contagious pustular dermatitis of sheep. *Austr Vet J* 1949;25:40-45.
20. Sawhney AN, Dubey S, Malik B. Diagnosis of contagious pustular dermatitis in sheep and goats by agar-gel precipitation test. *Indian Vet J* 1973;50:605-607.
21. Tórtora PJ. Ectima contagioso en ovinos y caprinos. Inmunidad y patogenia en recién nacidos (tesis de doctorado). Cuautitlán Izcalli (Edo. de México) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM, 1994.
22. Thomas V, Flores L, Holowczak J. Biochemical and electron microscopic studies of the replication and composition of milker's node virus. *J Virol* 1980;34:244-255.
23. Buddle BM, Dellers R, Schurig G. Heterogeneity of contagious ecthyma virus isolates. *Am J Vet Res* 1984;45:75-79.
24. Buddle BM, Dellers R, Schurig G. Contagious ecthyma virus-vaccination failures. *Am J Vet Res* 1984;45:263-266.
25. McKeever DJ, Reid HW, Inglis NF, Herring AJ. A qualitative and quantitative assessment of the humoral antibody response of the sheep to orf virus infection. *Vet Microbiol* 1987;15:229-241.
26. Haig DM, McInnes CJ, Nettleton P. Orf Moredun. *Res Inst Ann Rep* 1997:50-55.