

772/20/1001



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS  
PROFESIONALES CUAUTITLAN

## PRESENCIA DE ECTIMA CONTAGIOSO EN BORREGOS DE TULA, HIDALGO, MEXICO.

### T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO  
ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :  
BENEDICTO RODRIGUEZ Y SALAZAR

A S E S O R E S

M. V. Z. M. A., PABLO CORREA G.  
M. V. Z. PABLO HERNANDEZ J.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## C O N T E N I D O

INTRODUCCION

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

DISCUSION

CONCLUSION

RESUMEN

BIBLIOGRAFIA

## INTRODUCCION

### SINONIMIA.

Ectima contagiosum, Impétigo labialis, ectima de los labios, boca adolorida, dermatitis pustular contagiosa, boca costrosa, boca ulcerada, dermatitis pustulosa, estomatitis pustular contagiosa, hocico escamoso, - dermatitis labial infecciosa, dermatitis necrosante contagiosa de los ovinos y caprinos, ORF, periestomatitis pustular contagiosa, mucodermatitis pustular contagiosa, chancro, chancro botonoso, afta maligna, ulceración de labio y pierna (1, 2, 4, 7, 13, 23).

### HISTORIA.

Se le conoce en Inglaterra y en Francia desde 1888. Aynaud - - (1923) demostró que esta enfermedad era causada por un virus filtrable (14). En E.U.A. se le ha descrito desde 1910 (14); es frecuente en los rebaños del Oeste de los E.U.A. en primavera y en verano, y ocasionalmente se presenta en la parte oriental (4). En México desde hace tiempo se han observado borregos con signos clínicos y lesiones sospechosas de ectima contagioso. Sin embargo hasta ahora no se había logrado confirmar el diagnóstico, con base en pruebas específicas de laboratorio.

### IMPORTANCIA ECONOMICA.

En los corderos hay lesiones periorales que no les permiten mamar ni ingerir sus alimentos; puede haber extensión de las lesiones hacia el rumen (15), erosiones en la mucosa del esófago, abomaso e intestino --

delgado y en el tracto respiratorio (2), por esta razón hay pérdidas económicas por retraso del crecimiento y hay mortalidad que aumenta por presencia de infecciones secundarias y/o miasis cutáneas (2, 4, 14). En raras ocasiones hay brutes con invasión sistémica con mortalidad de 25 a 75% (2, 14). Las hembras que presentan lesiones en las tetas no permiten que los corderos mamen (2, 14, 18). Blood y Henderson (2) reportan que la mortalidad es de mayor importancia en corderos, que por ser los mayormente afectados, requieren de mayores cuidados y son más fácilmente atacados por infecciones secundarias, ocurriendo en ellos alta morbilidad y mortalidad (2, 14).

#### ESPECIES AFECTADAS.

Las especies más severamente afectadas son los ovinos y caprinos - (8) principalmente animales jóvenes de 4 a 6 meses de edad (2, 20). La infección en el hombre se presenta principalmente en aquellos que constantemente están manejando borregos infectados (4, 12, 14, 23).

Wilkinson (24) reportó en 1970 la infección en un perro; según algunos autores, el perro, caballo, cerdo, cuy, hamster y ratón son refractarios a la infección (12, 14); y hay discrepancia respecto a las terneras (1).

#### TRANSMISION EXPERIMENTAL.

La enfermedad ha sido transmitida experimentalmente al borrego, - cabra, bovino y conejo (5, 8, 14).

## DISTRIBUCION.

Se presenta probablemente en todas las regiones de la tierra en -- donde se cría al ganado lanar; está ampliamente distribuido en Australia, Nueva Zelanda (8, 14) Francia, Inglaterra y en E.U.A. (14).

## PERIODO DE INCUBACION.

Las primeras manifestaciones clínicas aparecen tras una incubación de 2 a 8 semanas en la infección natural (7) y generalmente de 2 a 5 -- días en la infección artificial (1, 8). Se ha reportado que el periodo de incubación depende de la dosis inoculada y éste será más largo cuando -- se aplican dosis pequeñas (14).

## CURSO.

Los síntomas comienzan con la formación de pápulas que se con -- vierten en pústulas y posteriormente vesículas que al romperse o secarse se transforman en costras, la piel se regenera debajo de las costras y la recuperación generalmente es total en 2 a 4 semanas sin formación de -- cicatrices; solo cuando el curso se complica debido a infecciones secundarias. este se prolongará (3, 7, 8, 14).

## PORTADORES SANOS.

Manninger (13) afirma que los animales que padecieron la enferme -- dad permanecen como portadores sanos durante varias semanas y que a -- partir de éstos, los animales susceptibles pueden infectarse. Algunos otros autores (4, 8, 13, 14) reportan que la infección ocurre por contacto di --

recto con animales afectados y objetos inanimados, penetrando el virus a la piel a través de escoriaciones y fisuras.

#### PRONOSTICO.

En animales adultos es leve, cuando el único agente que se encuentra en las lesiones es el virus del actima contagioso, ya que estos animales alcanzan su completa recuperación en un período de 2 a 5 semanas. - Cuando las lesiones son infectadas por agentes secundarios (bacterias o larvas de moscas) el período de recuperación es un poco más largo y la enfermedad puede llegar a ser fatal (4, 10, 14).

En animales jóvenes la enfermedad llega a ser fatal porque en éstos las lesiones se presentan principalmente en boca, labios, paladar, ollares y pezuñas y como consecuencia del dolor no maman ni ingieren sus alimentos, lo que los predispone a mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas, parasitarias y miasis y como consecuencia la muerte (2, 7, 14).

#### PREVALENCIA.

La mayoría de los autores coinciden en que las praderas en donde se tenían animales infectados en el verano, siguen siendo contagiosas durante la primavera siguiente (4, 13, 14) e incluso durante varios años (7). Su incidencia en las diferentes edades puede ser extremadamente variable (10).

#### SIGNOS CLINICOS EN LOS CORDEROS.

En las lesiones iniciales se presenta la formación de pápulas que se convierten en pústulas, estas pueden pasar inadvertidas y solo manifestarse

la presencia de la enfermedad en el hato hasta la aparición de las lesiones costrosas (2, 13, 14), las lesiones primarias se desarrollan generalmente en la comisura de los labios y a partir de aquí se extienden a la región perioral, mucosa bucal y orificios nasales (2, 7, 8, 13); en casos más severos las lesiones pueden desarrollarse también en las encías, cojinete dental, -- paladar y lengua (10).

El tamaño de las costras puede ser de 0.5 a 1 cm o más (2, 7, 8, - 10, 15). También se menciona que estas costras son muy dolorosas y que -- difícilmente puede uno desprenderlas (4, 7). Algunas costras tienen un color gris amarillento, otras varían de pardo rojizo a gris oscuro (7).

Los borregos más afectados son los que tienen de 3 a 6 meses de edad, los menos afectados son los menores de 3 meses y los adultos (7, 14). Estos borregos, al padecer la enfermedad desmejoran en forma notable su condición física, hasta el grado de mostrar emaciación por la imposibilidad que tienen para mamar y alimentarse, lo que predispone a una alta mortalidad simplemente por inanición (8, 10, 13, 15). Además de la mucosa bucal también se puede ver afectada la mucosa nasal, orejas y extremidades, con lesiones similares a las producidas en la boca (3, 7, 10, 13, 15).

#### FORMA GENITAL EN LA MADRE.

Algunos autores reportan que los signos que se presentan en la hembra, se manifiestan por flujo vaginal mucoso o purulento, ulceración en labios -- vulvares hinchados y dolorosos, formación de pústulas, erosiones y costras en



la piel de las tetas (13) y como consecuencia de ello mastitis (7) y predisposición a infecciones secundarias (2, 8).

#### FORMA GENITAL EN EL MACHO ADULTO.

Los machos pueden presentar úlceras en la piel del prepucio, con tumefacción, en la abertura prepucial y en el pene (7, 8, 13). Blood y - - Henderson (2) reportan lesiones en el escroto acompañadas de acumulación - de líquido en el saco escrotal (8).

Cabe agregar que tanto en los animales jóvenes como en los animales adultos se pueden presentar infecciones secundarias, siendo más comunes las infecciones por Fusobacterium necrophorus llegando a formar focos necróticos en las lesiones que se presentan en la laringe, pulmón, rumen, retículo, -- omaso, abomaso (4, 14, 15, 20) e intestino delgado (2).

#### PATOGENESIS.

El virus penetra la piel a través de escoriaciones y fisuras, formándose en la zona de penetración un edema intersticial con infiltración de linfocitos mononucleares (2, 13, 21); las células de la capa de Malpigio aumentan de tamaño, su citoplasma se vacuoliza y los núcleos se arrugan y se produce lo que se conoce como período papuloso (7, 10). La vacuolización se -- hace más evidente y se produce la infiltración de linfocitos polimorfonucleares; a este período se le conoce como vesiculopustuloso (7). Las vesículas -- contienen abundante material vírico; estas vesículas, en la piel de los labios se rompen como al octavo día y después se secan y se forman costras que si

son desprendidas, dejan una superficie que sangra fácilmente; pueden presentarse infecciones secundarias y formarse áreas de necrosis, supuración e incluso puede haber septicemia (13). La piel se regenera aproximadamente a partir de la segunda a la cuarta semana, la recuperación es total y sin formación de cicatrices (8, 14, 20).

#### TRANSMISION.

La transmisión en los rebaños es muy rápida y se adquiere a través de - escoriaciones y fisuras existentes en la piel y puede ocurrir al contacto con - animales afectados u objetos inanimados (2, 13). Se ha demostrado que en - algunos lugares ocurre con mayor frecuencia en épocas secas, propiciada por - las escoriaciones de la boca producidas por el alimento seco contaminado con el material costroso, que se desprendió de los otros animales que padecieron - la enfermedad (2, 13).

La transmisión en el hombre por lo general ocurre en forma accidental, - cuando no se tiene cuidado al manejar ovinos infectados, o al manipular material contaminado. La enfermedad en el hombre puede producir lesiones típicas - en brazos y manos, que por lo general son leves y transitorias (4, 8, 10, 13, - 23).

#### LESIONES A LA NECROPSIA.

Los borregos están emaciados y las lesiones se presentan en boca, patas, - ubre y genitales (1, 2, 10, 13). En raras ocasiones se presentan lesiones en la mucosa de la laringe, esófago, rumen, retículo y abomaso (14, 15, 20) e intes

lino delgado (2), casi siempre asociadas con infecciones secundarias (10). - Se ha señalado que estas lesiones en la mucosa digestiva miden de 1 a 2 cm de diámetro (15).

#### HISTOPATOLOGIA.

Los cambios histopatológicos son muy parecidos a los producidos por -- otras enfermedades causadas por virus pax (2). Estas lesiones son histológicamente similares, independientemente de la zona donde se produzcan, caracterizadas por acantosis (10, 15) degeneración balonizante (15, 24) e hiperqueratosis (15). Las células escamosas y estratificadas cercanas a la superficie se encuentran aumentadas de tamaño y tienen picnosis nuclear y citoplasma vacuolizado (15). Las células balonizadas ocasionalmente forman pequeñas vesículas superficiales, algunas con neutrófilos (15, 20, 21). La capa germinal de células se extiende dentro de la submucosa y está muy engrosada por muchas células retículoendoteliales, fibroblastos jóvenes y linfocitos (15). En áreas focales estas células se extienden dentro de las capas musculares y en el rumen se encuentran principalmente en la subserosa (15). Algunos autores mencionan la presencia de inclusiones intracitoplásmicas (10, 15).

#### PROPIEDADES DEL VIRUS.

Es un virus DNA doble banda de A.N. (1) que pertenece a la familia poxviridae (19) es filtrable y altamente epiteliotrópico, morfológicamente parecido al virus de la viruela (13) tiene forma de paralelepípedo o elipsoide y mide de 200 a 300 m u (7). Brunner y Gillespie (4) citan que el tamaño del virus es de 158 a 252 m u.

El virus resiste mucho la desecación y a temperatura ambiente mantiene su viabilidad hasta por 15 años (2). Se afirma que a temperatura ambiente - las costras que caen al suelo pierden su virulencia cuando permanecen de 30 a 60 días en el caluroso verano de Texas (4); la luz y los rayos solares lo - inactivan, así como las álcalis, ácidos, fenol (7) y cloroformo (22).

Mediante la exposición a temperatura directa se ha demostrado que es destruido por el calor a 58°C o a 60°C durante media hora (4). Se ha comprobado que en 30 a 60 días a temperatura ambiente, durante el verano, el material morbosos pierde su infectividad; las costras que quedaron en los terrenos en otoño e invierno fueron infectantes en la primavera siguiente; a - esto se le atribuye, el que sea una enfermedad que se presenta año tras año (14).

Se ha señalado que el cultivo en embrión de pollo da resultados insatisfactorios (4, 14). Por otra parte también se ha descrito por otros autores - que los cultivos en embrión de pollo son parcial o totalmente satisfactorios - (2, 7, 10, 13, 22).

Otros autores han obtenido resultados altamente satisfactorios al inocular cultivos celulares (10, 14) de riñón fetal de borrego (6) y de cordero (17).

#### DIAGNOSTICO.

El diagnóstico clínico se realiza tomando en cuenta el estudio minucioso de la sintomatología y la observación de las lesiones en los animales sospechosos (7, 13, 14, 21, 23). El diagnóstico de confirmación se efectúa por - -

reacciones serológicas como pruebas de neutralización o de fijación de complemento (7); por el aislamiento e identificación del virus en el microscopio electrónico (7, 9, 12, 19, 24), por histopatología (4, 12, 21, 24), la reproducción de la enfermedad en animales de experimentación, tales como -- corderos y cabras susceptibles (1, 7, 8), inoculación a cultivos celulares -- (6, 10, 14, 16, 17) y mediante la prueba de anticuerpos fluorescentes (12).

Se debe tener cuidado para no confundir la enfermedad con la lengua azul, dermatitis ulcerativa y viruela ovina, principalmente (2, 7). Por lo que se recomienda hacer uso de pruebas serológicas (7), ya que en algunas ocasiones presentan sintomatología parecida. La forma podal debe ser diferenciada con el panadizo epizootico o pedero (7).

#### INMUNIDAD.

Varios autores reportan que aquellos animales que se han recuperado de la infección adquirida en condiciones naturales, son resistentes y quedan sólidamente inmunes por períodos de 28 meses o aún más (4, 7).

#### VACUNACION.

Se ha utilizado una preparación de material infectante a partir de las costras, homogeneizadas y suspendidas en solución salina fisiológica o en agua glicerizada; inoculando esta substancia, con una lanceta para vacunar, en la cara interna de la oreja, se frota sobre la piel previamente escarificada de la ingle (13). Observando que se obtienen buenos resultados. Cuando la vacunación es efectiva, solo se produce una lesión poco molesta para el cordero (14).

En los rebaños que son afectados año tras año, se recomienda vacunar a los animales de 6 a 8 semanas de edad, ya que la inmunidad es sólida - hasta las 3 semanas después de la vacunación y se mantiene efectiva por lo menos durante 2 años. En algunos países se usan vacunas comerciales con virus modificadas (11).

#### ERRADICACION Y CONTROL.

En los países en donde la enfermedad es enzoótica, como en los de Europa, se recomienda la vacunación cada año durante la primavera, antes de comenzar la estación del pastoreo (2, 4). En los rebaños amenazados o infectados puede recurrirse a la inmunización activa. Es posible lograr una inmunidad efectiva con virus virulento mediante la escarificación cutánea en la cara interna de los muslos o en las zonas desprovistas de lana en la piel de la región torácica lateral (7). En los países en donde la enfermedad no existía con anterioridad se podrían establecer cuarentenas e intentar la erradicación mediante el sacrificio de todos los animales infectados.

#### LA ENFERMEDAD EN EL HOMBRE.

La transmisión al hombre por lo general ocurre en forma accidental, - cuando no se tiene cuidado al manejar ovinos infectados o el virus vacunal. La enfermedad en el hombre produce lesiones pustulares típicas de ectima - contagioso en brazos y manos, que por lo general son leves y transitorias (9, 14, 17, 23) aunque se han descrito casos con lesiones vesiculares grandes y múltiples, infarto en los ganglios linfáticos auxiliares, dolor local en la lesión, frecuentes infecciones secundarias y curación muy lenta (4).

## MATERIALES Y METODOS

## HISTORIA CLINICA

Se estudió un rebaño de raza Suffolk, que de acuerdo con los informes proporcionados por los ganaderos procedían de San Angelo, Texas, E.U.A., desembarcado a principios de enero de 1979, en Tula, Hidalgo, México, en donde llegaron y permanecieron en buenas condiciones. Había 50 machos y 1,200 hembras, todas gestantes, faltándoles de 1 a 2 meses para parir. A fines de febrero de 1979, en los corderos jóvenes se empezaron a presentar signos y lesiones sospechosas de ectima contagioso, con formación de pápulas y costras en los labios, región perioral y paladar. Enfermaron de ectima aproximadamente 450 corderos y finalmente la mortalidad fue de 900 a consecuencia del ectima, aunado a complicaciones secundarias por debilidad, parasitosis y enfermedades bacterianas. En aproximadamente 50 madres hubo lesiones papulosas y costras en la ubre, sin mortalidad. El curso llegó a ser de un mes y a los 3 ó 4 meses desapareció el brote.

## OBJETIVO.

Confirmar la presencia de ectima contagioso en borregos de Tula, Hidalgo, México, mediante la historia clínica, los signos clínicos, la reproducción de la enfermedad, estudios de histopatología, la prueba de anticuerpos fluorescentes, y la observación del virus al microscopio electrónico.

Se recibieron dos corderos de dos meses de edad, procedentes del rebaño afectado en Tula, Hidalgo, que presentaban lesiones sospechosas de ectima contagioso, principalmente en la piel de los labios (Figura 1), mucosa



Figura 1. Lesiones de ectima còntagioso de los borregos en la regi3n perioral de un cordero.



bucal y paladar. Se obtuvieron biopsias, las que fueron transportadas en refrigeración al Departamento de Virología, para después almacenarlas en un congelador REVCO, a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### PREPARACION DEL ESPECIMEN SOSPECHOSO DE CONTENER ECTIMA - - CONTAGIOSO.

Se sacaron las muestras del REVCO y se manejaron en una Unidad de Flujo Laminar, en donde se colocaron más o menos 3 cm cúbicos de las - - muestras, en un mortero con pistilo, conteniendo arena de mar estéril, utilizando 9 ml de medio de Eagle, sin suero. Se realizó el macerado en refrigeración, hasta hacer una mezcla homogénea, la que se colocó en un tubo de ensaye estéril. Se cerró y se procedió a centrifugar a 3,000 rpm durante 30 minutos, en refrigeración. Pasado este tiempo, el sobrenadante que - contenía el material infectante se envasó en viales, desechando el sedimento. Este sobrenadante se distribuyó en alícuotas de 1 ml y se procedió a - - congelarlas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se descongeló uno de los viales, se le - agregaron 6,000 UI de penicilina, 12 mg de estreptomycin y 300 unidades - de fungizona, incubando 20 minutos a temperatura ambiente. Después de ésto el material infectante, estaba en condiciones de ser inoculado a corderos - - susceptibles.

#### EXPERIMENTO 1.

Con este material se inocularon dos corderos de aproximadamente dos - meses de edad, clínicamente sanos, procedentes de Tulancingo, Hidalgo. Es-

tos corderos fueron previamente sangrados para determinarles su biometría -- hemática, y a los 4, 10, 15 días postinoculación se les volvieron a tomar - muestras para este estudio; esta sangre fue enviada al Departamento de Fisiopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (I.N.I.P.), -- S.A.R.H., en frascos conteniendo EDTA. Diariamente se les registró su temperatura rectal, desde 5 días antes de la inoculación y se continuó su registro durante todo el experimento, el cual duró 21 días. La inoculación se realizó en los labios (al cordero 1, en el labio inferior, y al cordero 2, en el labio superior) en tres puntos diferentes, dos laterales y uno en el centro del labio correspondiente, en cada punto se inocularon 0.1 ml de inóculo. A partir del tercer día después de la inoculación, en los tres puntos inoculados se presentó una marcada reacción inflamatoria, con lesiones similares a las descritas para el ectima contagioso. Ese día se realizó la primera biopsia, la segunda al noveno día y la tercera al décimo quinto día. Estas fueron obtenidas con una navaja de rasurar esterilizada y después fueron transportadas al Departamento de Virología, en cajas de aluminio estériles, en donde se dividieron en partes, para posteriormente enviarlas a los Departamentos de: Bacteriología e Histopatología del I.N.I.P., S.A.R.H., y al Departamento de Microscopía Electrónica del Instituto Mexicano del Seguro Social (I.M.S.S.) utilizando métodos adecuados de preparación y envío de muestras.

#### PREPARACION Y ENVIO DE MUESTRAS.

Al Departamento de Bacteriología se le envió aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> -- de cada muestra en cajas de aluminio esterilizadas, manteniéndolas siempre en

refrigeración.

Al Departamento de Histopatología se le envió la misma cantidad de cada muestra en un frasco conteniendo formal al 10%.

Al Departamento de Fisiopatología se le envió sangre en frascos con anticoagulante ACIDO ETILENDIAMINOTETRA-ACETICO (EDTA).

Para el Departamento de Microscopía Electrónica, las muestras de tejidos fueron finamente fragmentadas con una navaja de rasurar esterilizada, formando barras de tejido de aproximadamente 1 X 3 mm, orientadas de tal forma que fuera posible reconocer la epidermis y la dermis en cada corte. Inmediatamente después de obtenida la biopsia y hecha la fragmentación, los cubos de tejido se fijaron en gluteraldehído al 3%, en amortiguador de fosfatos con pH de 7.4, 0.1 M, a 4°C, durante 3 horas. Se lavaron en el mismo amortiguador y se fijaron en tetroóxido de osmio al 1%. Las muestras se deshidrataron en alcoholes ascendentes y se incluyeron en resina araldita. Se obtuvieron secciones de 1 micra, que se tiñeron con azul de toluidina, que permitió orientarse para buscar en las células de la epidermis las partículas virales. Una vez realizado este procedimiento se cortaron secciones de 400 a 600 A° en un Ultramicrotomo Porter Blum MT2, se recogieron las secciones en rejillas de cobre y se contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo y se observaron en un microscopio electrónico Philips EM 300.

## EXPERIMENTO II.

Con el espécimen original, sospechoso de contener ectima contagioso, se

realizó una segunda inyección, intradérmica en la piel del labio, a los corderos inicialmente inoculados; esto fue hecho a los 30 días después de la primera inoculación.

Se realizaron los siguientes pasos.

- a) Antes de inocular los corderos se tomaron muestras de sangre a cada uno, en frascos conteniendo EDTA, para realizarles la biometría hemática; se les volvió a tomar muestras a los 6 días después para biometrías, se les registró la temperatura rectal desde 5 días antes de la inoculación y se continuó tomando durante todo el experimento, que duró 22 días.
- b) Con una hoja de afeitar se rasuró la parte dorsal de los corderos y se marcaron en dicha parte 15 cuadros de aproximadamente  $2 \text{ cm}^2$  cada uno.
- c) Se inocularon en el centro de cada uno de los cuadros 0.1 ml de espécimen original; en iguales cantidades se inocularon tres puntos diferentes — del labio (cordero 1, labio superior; cordero 2, labio inferior).

Siguiendo el mismo procedimiento de recolección, preparación y envío de muestras se tomaron biopsias durante el primero, segundo y tercer día en que se presentaron las reacciones inflamatorias (4, 5 y 6 días postinoculación). Los especímenes fueron enviados a los Departamentos de Histopatología y Microscopía Electrónica, para realizar los estudios correspondientes. Se dejó una parte de estas muestras en el Departamento de Virología. No se colectaron muestras para estudios de Bacteriología.

## EXPERIMENTO III.

Con el objeto de dar un segundo pase, se inoculó a otro cordero clínicamente sano, con el espécimen obtenido del macerado preparado de las lesiones que se formaron en los corderos inoculados experimentalmente.

Antes de inocular, se sangró al cordero para determinar su biometría hemática; no se realizaron biometrías hemáticas postinoculación. Se registró la temperatura rectar desde 5 días antes de la inoculación hasta 21 días después, tiempo que duró el experimento. Se procedió a rasurar la parte dorsal del cordero y se marcaron en dicha parte 15 cuadros de 4 cm<sup>2</sup> cada uno, 7 de un lado y 8 del otro, inoculando 0.1 ml en el centro de cada uno de los cuadros; además se hicieron 6 inoculaciones en los labios, 3 en el labio superior y 3 en el labio inferior. Se realizaron biopsias de las lesiones al segundo y tercer día en que se presentaron las reacciones inflamatorias (octavo y noveno día postinoculación) para realizar con ellas más estudios de Histopatología y Microscopía Electrónica. No se colectaron muestras para estudios de Bacteriología. Se observó diariamente al animal y se describió el tipo de inflamación que se presentaba en las lesiones, las cuales aparecieron únicamente en algunos de los puntos inoculados (4 en el dorso y 5 en los labios).

## PRUEBA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES

El conjugado para la prueba de anticuerpos fluorescentes fue proporcionado por el Dr. G.A. Erickson, del Veterinary Service Laboratory, Animal and Plant Health Inspection Service, U.S. Department of Agriculture, U.S.A.

## DILUCION DEL CONJUGADO.

- 1) Se tomaron 0.5 ml del conjugado, se colectaron en un tubo de ensaye estéril y se le agregaron 4.5 ml de diluyente (PBS, IX, estéril, pH 7.0) se agitó perfectamente quedando así a la dilución de 1:10; fue distribuido en alícuotas de 0.5 ml, rotulado y congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
- 2) Se tomó uno de los viales que contenían 0.5 ml de conjugado (diluido 1:10) y este se colocó en un tubo de ensaye estéril agregando 4.5 ml de PBS, y agitando esta mezcla perfectamente, quedando así a la dilución de 1:100; esta dilución fue la utilizada para la realización de la prueba.

PREPARACION DE LA MUESTRA.- Se tomó una biopsia de aproximadamente  $1\text{ cm}^3$ , a partir de las lesiones presentes en el labio de uno de los corderos presentados para diagnóstico (muestra positiva); y se colectó también aproximadamente  $1\text{ cm}^3$  de la piel del labio de un cordero clínicamente sano (muestra negativa). A estas muestras de tejido se les realizaron cortes con un crióstato, de un grosor de 6 micras de tal forma que se pudieran observar las diferentes estructuras de la piel. Se colectaron en un portaobjetos para después fijarlas en acetona durante 10 minutos y posteriormente teñirlas con el conjugado.

TINCION DIRECTA CON LOS ANTICUERPOS FLUORESCENTES.- Se descongeló uno de los viales de conjugado, diluido 1:100 y con este se cubrieron -- ambas muestras (positiva y negativa) hasta humedecerlas completamente, incuban

do a 37°C durante 30 minutos en una estufa de cultivo humidificada. Después de este tiempo se lavaron las muestras con PBS, IX, metiéndolas y sacándolas 5 veces, y se volvieron a lavar con PBS, IX, dejándolas hundidas durante 10 minutos y posteriormente se enjuagarán en agua destilada, metiéndolas y sacándolas 5 veces para finalmente secarlas dentro de una estufa a 37°C durante 5 a 10 minutos. Una vez secas se sacaron de la estufa y se colocó sobre las preparaciones una gota de una solución de PBS con glicerina (volumen por volumen); posteriormente las muestras fueron observadas al microscopio de fluorescencia Inmunopan (American Optical) equipado con lámpara de halógeno, con objetivo fluor 16/0,50 160/0.17 7 y oculares PK 5X.

## R E S U L T A D O S

## PERIODO DE INCUBACION ANTE LA INOCULACION EXPERIMENTAL.

Ante la inoculación experimental, los corderos presentaron lesiones características del ectima contagioso (Figura 2) a partir de las 24 horas en el experimento I y a partir de los 4 días en el experimento II. Al dar un segundo pase del virus en otro cordero clínicamente sano (experimento III) se volvió a presentar la enfermedad con lesiones similares (cuadro 3) con la diferencia que tardaron 7 días en presentarse y que éstas no fueron tan marcadas como en la primera inoculación (cuadro 1).

OBSERVACION MACROSCOPICA DE LAS LESIONES PRESENTES EN EL  
EXPERIMENTO I.

En ambos corderos, en los puntos inoculados se presentó una leve reacción inflamatoria a partir de las 24 horas. Las lesiones únicamente se presentaron en los sitios en donde se realizaron las inoculaciones.



## CUADRO 1

CARACTERISTICAS DE LAS AREAS INFLAMADAS Y BIOPSIAS COLECTADAS  
EN EL EXPERIMENTO I.

BIOPSIA	DIAS POSTINOCU- LACION	ASPECTO	DOLOR POR PRESION	RUBOR	CALOR <u>a/</u>
no	0	normal	-	-	-
no	1	inflamado ( <u>+</u> )	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>
no	2	inflamado ( <u>+</u> )	++	++	++
1	3	pápula	++	++	++
no	4	pápula	++	++	++
no	5	pápula	++	++	++
no	6	pápula	++	++	++
no	7	pápula	++	++	++
no	8	pápula	++	++	++
2	9	pápula	++	++	++
no	10	pápula	++	++	++
no	11	pápula	++	++	++
no	12	pápula	++	++	++
no	13	pápula	++	++	++
no	14	pápula	++	++	++
3	15	costra	++	++	++

a/ Aumento de temperatura en el área inoculada.



Figura 2. Reacción inflamatoria en el labio de un cordero - -  
inoculado experimentalmente con ectima contagioso de los borregos

OBSERVACION MACROSCOPICA DE LAS LESIONES PRESENTES EN  
EL EXPERIMENTO II.

En el cordero 1, se presentaron únicamente reacciones inflamatorias, - en 9 de los 15 puntos inoculados (6 en el dorso y 3 en el labio); y en el - cordero 2, las reacciones inflamatorias se presentaron únicamente en 6 puntos, de los 15 inoculados (3 en el dorso y 3 en el labio). Otra diferencia presen- te fue que tardaron más tiempo en presentarse las lesiones y que éstas no - - fueron tan marcadas como en la primera inoculación (4 días).

CUADRO 2

CARACTERISTICAS DE LAS BIOPSIAS COLECTADAS EN EL EXPERIMENTO II.

BIOPSIA	DIAS POSTINOCU- LACION	ASPECTO	DOLOR	RUBOR	CALOR <u>a/</u>
no	0	normal	-	-	-
no	1	normal	-	-	-
no	2	normal	-	-	-
no	3	normal	-	-	-
1	4	inflamado (+)	<u>b/</u>	<u>b/</u>	<u>b/</u>
2	5	inflamado (+)	<u>b/</u>	<u>b/</u>	<u>b/</u>
3	6	pápula	<u>b/</u>	<u>b/</u>	<u>b/</u>

a/ Aumento de temperatura en el área inoculada.

b/ No se tomó nota de este dato.

OBSERVACION MACROSCOPICA DE LAS LESIONES PRESENTES EN EL - -  
EXPERIMENTO III.

En este cordero se empezaron a presentar las reacciones inflamatorias - a los 7 días después de la inoculación, en forma leve (Figura 3). Las lesiones se presentaron únicamente en algunos puntos donde fue depositado el - - inóculo; de las 15 inoculaciones realizadas, en el dorso únicamente se presentaron 4 reacciones, las cuales eran poco marcadas; de las 6 inoculaciones realizadas en los labios, solo en 5 puntos inoculados se presentaron reacciones inflamatorias. En los demás puntos inoculados no se presentaron reacciones inflamatorias durante todo el experimento.



Figura 3. Lesiones iniciales en el labio superior -  
de un cordero inoculado con ectima contagioso de -  
los borregos, segundo pase.

## CUADRO 3.

CARACTERISTICAS DE LAS BIOPSIAS COLECTADAS EN EL EXPERIMENTO III.

BIOPSIA	DIAS POSTINOCU- LACION	ASPECTO	DOLOR	RUBOR	CALOR <u>a/</u>
no	0	normal	-	-	-
no	1	normal	-	-	-
no	2	normal	-	-	-
no	3	normal	-	-	-
no	4	normal	-	-	-
no	5	normal	-	-	-
no	6	normal	-	-	-
no	7	inflamado ( + )	+	+	+
1	8	inflamado ( + )	+	+	+
2	9	pápula	+	+	+

a/ Aumento de temperatura en el área inoculada.

## RESULTADO BACTERIOLOGICO DE LAS LESIONES EN EL EXPERIMENTO I.

En este experimento se realizaron tres biopsias para hacer estudios de bacteriología; la primera se realizó al tercer día después de la inoculación, encontrando en dicha muestra Staphylococcus aureus. De la segunda biopsia, realizada al noveno día después de la inoculación, se aislaron levaduras; la tercera biopsia que se realizó al décimoquinto día, resultó negativa a bacterias.

## CUADRO 4

RESULTADO DE LAS BIOMETRIAS HEMATICAS EN EL EXPERIMENTO I.

DIAS POSTINOCU- LACION	OVINO (No.)	ERITROCITOS		LEUCOCITOS	
		(Por mm <sup>3</sup> )	INTERPRE- TACION	(Por mm <sup>3</sup> )	INTERPRE- TACION
0	1	15 800	normal	3 700	normal
	2	15 300	normal	5 150	normal
4	1	14 600	normal	4 000	normal
	2	21 550	a/	5 050	normal
10	1	13 250	normal	5 700	normal
	2	14 000	normal	12 500	normal
15	1	12 600	normal	5 600	normal
	2	8 800	normal	4 600	normal
Control	3	14 950	normal	5 550	normal

a/ Aumentada ligeramente.



## CUADRO 5

RESULTADO DE LAS BIOMETRIAS HEMATICAS EN EL EXPERIMENTO II.

DIAS POSTINOCU- LACION	OVINO (No.)	ERITROCITOS (Por $\text{mm}^3$ )	INTERPRE- TACION	LEUCOCITOS (Por $\text{mm}^3$ )	INTERPRE- TACION
6	1	11 700	normal	7 750	normal
	2	14 350	normal	6 800	normal
Control	3	14 850	normal	11 500	normal

## CUADRO 6

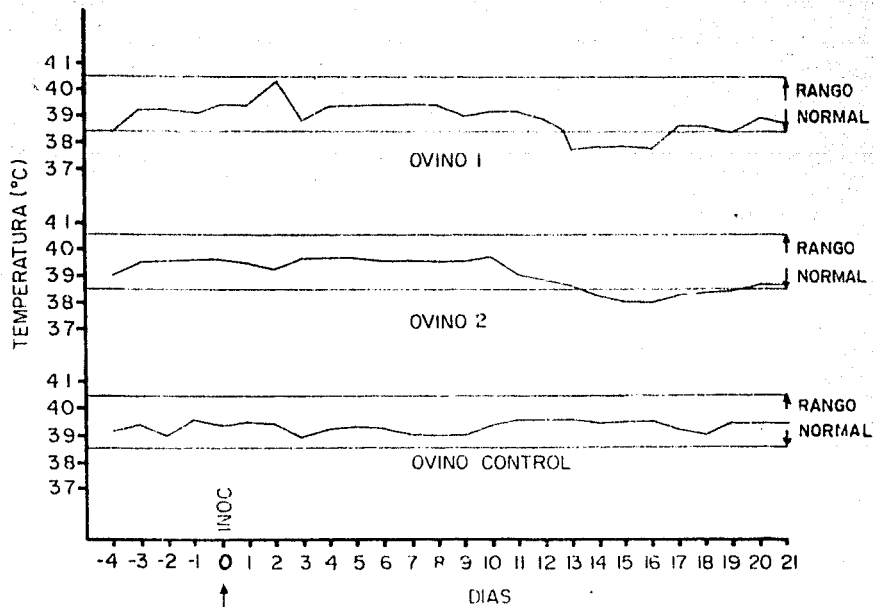
RESULTADO DE LA BIOMETRIA HEMATICA EN EL EXPERIMENTO III.

DIAS POSTINOCU- LACION	OVINO (No.)	ERITROCITOS (Por mm <sup>3</sup> ) INTERPRE- TACION	LEUCOCITOS (Por mm <sup>3</sup> ) INTERPRE- TACION
0	3	15 700 normal	10 500 normal

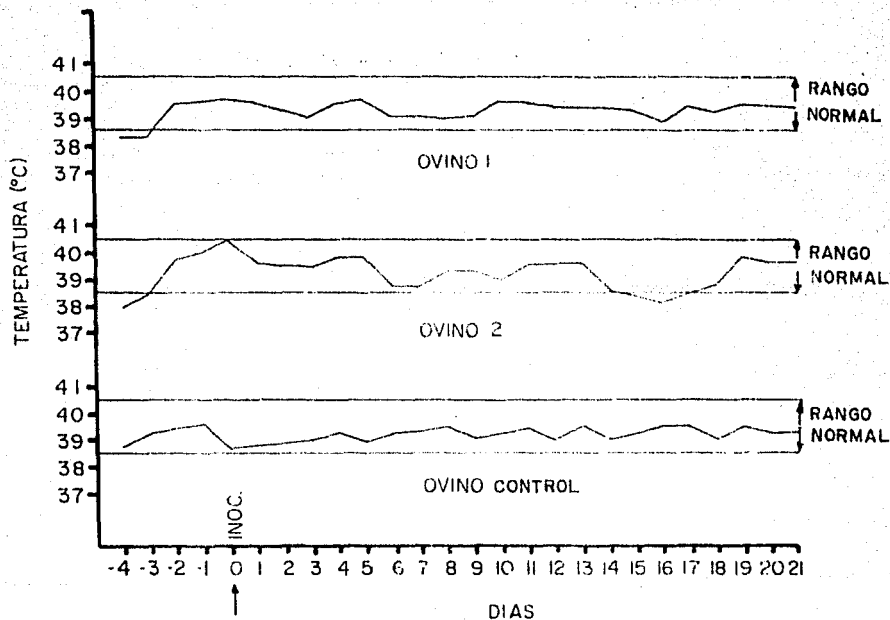
Los resultados de los registros de las temperaturas rectales diarias estan anotados en las gráficas 1, 2 y 3.

# GRAFICA.- I

## TEMPERATURA RECTAL DURANTE EL EXPERIMENTO I

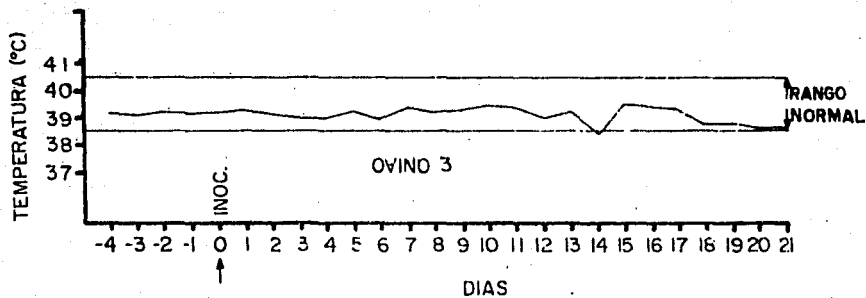


## TEMPERATURA RECTAL DURANTE EL EXPERIMENTO II



### GRAFICA-3

#### TEMPERATURA RECTAL DURANTE EL EXPERIMENTO III



## RESULTADO HISTOPATOLOGICO EN EL EXPERIMENTO I.

En la biopsia obtenida al tercer día después de la inoculación se observó lo siguiente:

En el ovino 1, hubo una reacción inflamatoria en la dermis, caracterizada por la presencia de polimorfonucleares en diferentes estados de degeneración. En menor proporción se encontraron linfocitos y células plasmáticas. Se apreció una infiltración difusa moderada de eosinófilos en la dermis.

En el ovino 2, hubo múltiples áreas focales de infiltración sobre todo en la epidermis y algunas en la dermis, constituidas por una infiltración -- predominante de células polimorfonucleares y en menor proporción linfocitos, células plasmáticas y algunos eosinófilos y presencia de edema moderado en estas áreas lesionadas.

## RESULTADO HISTOPATOLOGICO EN EL EXPERIMENTO II.

En el ovino 1, en las muestras tomadas en los primeros días de la -- presentación de la reacción (a partir de los 4 días postinoculación) se observó balonización en las células del estrato espinoso (Figura 4).

En el ovino 2 se observó balonización en las células del estrato espinoso y presencia de pústulas en el estrato escamoso (córneo).

## RESULTADO HISTOPATOLOGICO EN EL EXPERIMENTO III.

En el ovino 3, se observaron pústulas en el estrato córneo.

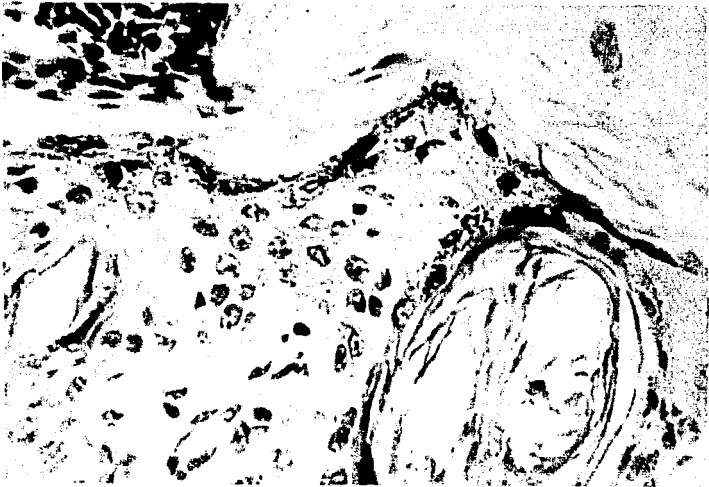


Figura 4. Balonización en las células del estrato espinoso de la piel del labio de un cordero inoculado con ectima contagioso de los borregos.



## RESULTADOS OBTENIDOS AL OBSERVAR EN EL MICROSCOPIO ELECTRONICO.

Los queratinocitos de la epidermis estudiada, mostraron células infectadas en proporción de 1 en 30. Las células infectadas contenían matrices virales (Figura 5) caracterizadas por contener material finamente granular y -- debilmente electrodensó, que ocupaba gran parte del citoplasma, eliminando los organelos celulares habituales. En la matriz viral, se definieron partículas virales en etapas de ensamble, caracterizadas por partículas esféricas con membranas concéntricas (Figura 5). A medida que las partículas virales avanzaban en su maduración, adquirían un centro electrodensó rodeado por una doble membrana (Figura 6 y 7). En la periferia de la matriz, y en áreas compuestas por finas fibrillas, se reconocieron partículas virales ovaladas, con núcleos que al corte se ven alargados, tal como corresponden a los virus pox (Figura 5 y 7).

Como resultado del seccionamiento de las partículas virales a diferentes niveles de su estructura, es posible definir, en ocasiones, la cubierta externa en donde se visualiza una corona de peplómeros (Figura 7). En la mayoría de las secciones, los virus adoptan forma ovoide, se revisten de varias capas o membranas concéntricas y tienen un centro laminar electrodensó que circunda un centro claro (Figura 7). Cuando la sección es superficial a la membrana, es posible definir estriaciones (Figura 6 y 7 doble flecha). Las partículas virales completas, se les determinó su longitud y diámetro, encontrándose que medían 290 X 148 nanómetros (nm). Las partículas virales e inclusiones se demostraron principalmente en los queratinocitos, aunque también hubo buen número de partículas virales en el estrato granuloso (Figura 8).

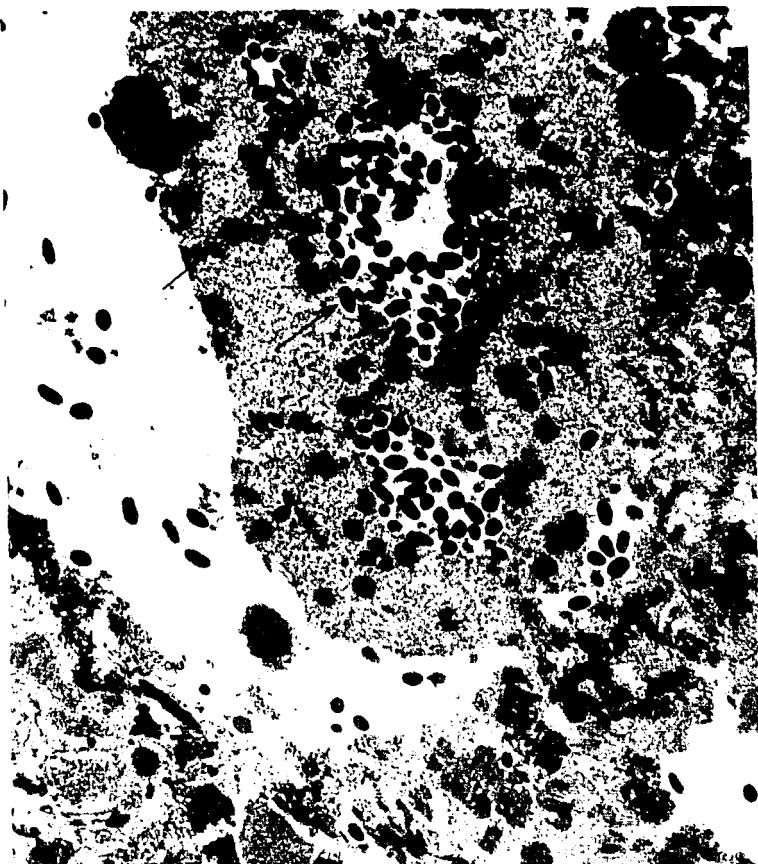


Figura 5. Micrografía electrónica del citoplasma de un queratinocito infectado con virus pox del ecthima contagioso. Note los tonofilamentos ( T ). En el citoplasma se identifica una matriz viral ( M ) en donde se observan varios estadios evolutivos de los viriones. (Flechas) X 20,790.

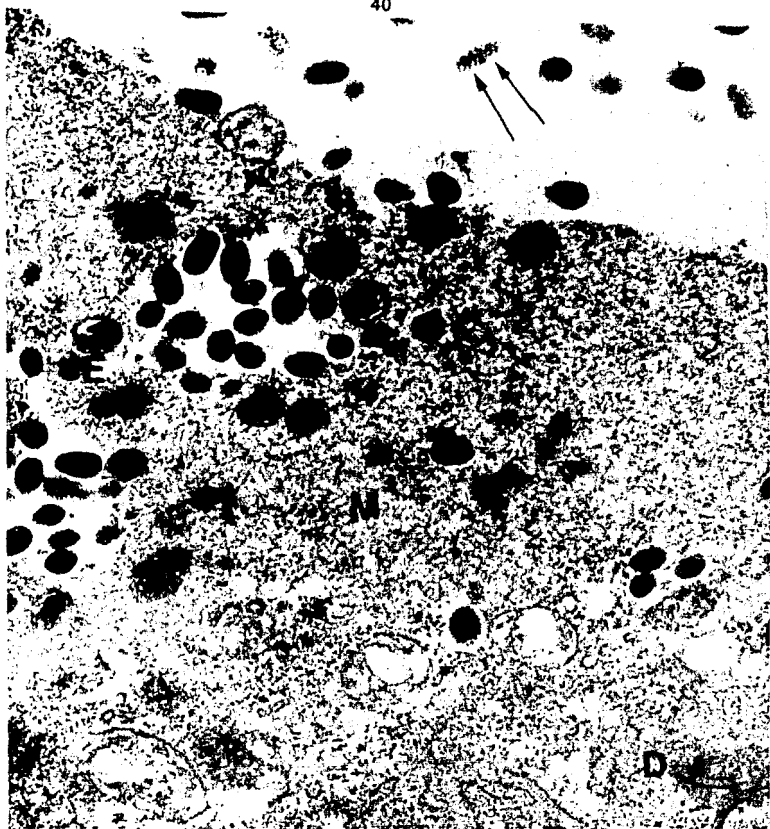


Figura 6. Micrografía electrónica a mayor amplificación de la matriz viral ( M ) - de uno de los queratinocitos infectados con el pox virus del ectima contagioso. Note los desmosomas ( D ) del queratinocito, como puntos de unión con células vecinas, - la matriz viral ( M ), los viriones en fase de ensamble ( E ) y los viriones maduros - uno de ellos (Doble flecha) muestra estrilaciones en la superficie de la membrana - - (flechas) X 32,340.

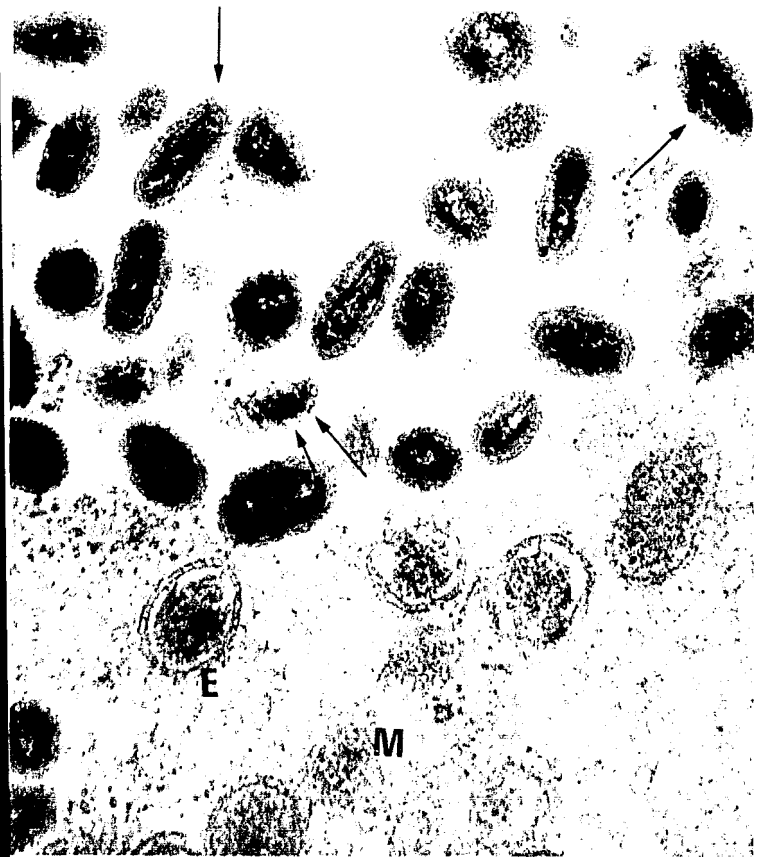


Figura 7. Micrografía electrónica de la matriz viral ( M ) de un queratinocito. Con detalle se delimitan las múltiples membranas concéntricas que forman a los viriones en ensamble ( E ). Note que uno de los viriones muestra espículas en la membrana exterior ( flechas ) y a otro nivel de sección permite ver las estriaciones, ( doble flecha ) - -

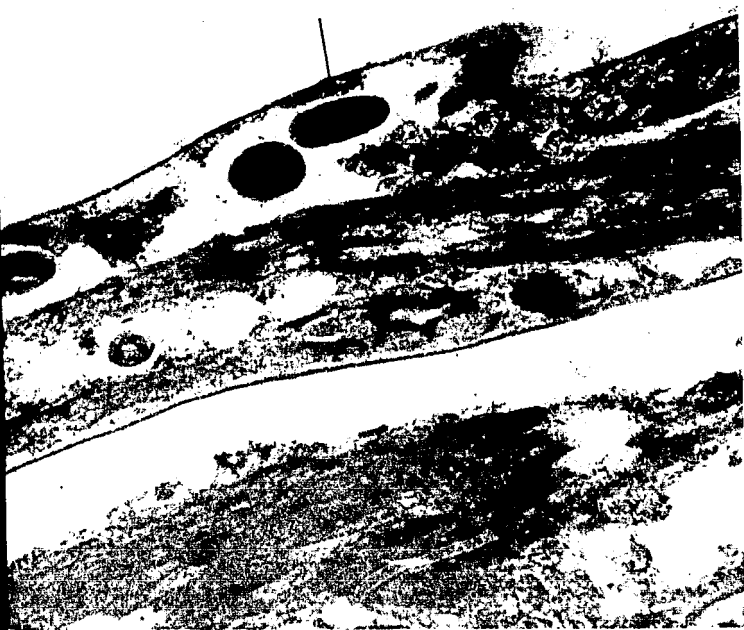


Figura 8. Micrografía electrónica de la queratina del estrato córneo epitelial. Note los viriones maduros del ectima contagioso rodeados de queratina (Flecha) X 25,410.

**RESULTADO DE LA PRUEBA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES.**

Los resultados de la prueba de anticuerpos fluorescentes, demostraron que el antígeno viral se encontraba en las áreas afectadas de la piel, de los cordones presentados para diagnóstico.

## DISCUSION

La historia, los signos clínicos y las lesiones observadas en los corderos presentados originalmente, fueron bastante sugestivas de ectima contagioso.

Al reproducir la enfermedad inoculando corderos susceptibles, éstos presentaron una marcada reacción inflamatoria entre los 2 y los 7 días en los puntos de inoculación. Varios autores mencionan que en la transmisión experimental el período de incubación depende de la cantidad de virus inoculado, de modo que pueden empezar a presentarse los signos y lesiones características entre los 2 y los 10 días (1, 14). En la región dorsal, únicamente en algunos puntos hubo reacción inflamatoria poco marcada y se observó un período de incubación mas largo. Al realizar el segundo pase en otro cordero clínicamente sano y procedente de áreas libres de la enfermedad, se volvieron a presentar lesiones características al séptimo día, en algunos de los puntos inoculados en los labios, y solo reacciones leves en algunos de los puntos inoculados en la región dorsal. Esto hace pensar que el inóculo del primer pase contenía menos virus que el original, por lo tanto tardó más tiempo en presentarse la reacción inflamatoria.

La temperatura rectal por lo general estuvo dentro de los límites normales, durante todo el experimento. En las biometrías hemáticas el número de eritrocitos por lo general se encontró dentro de los límites normales. En la bibliografía no se menciona que en esta enfermedad se presenten cambios en

la temperatura o en las biometrías hemáticas.

Al estudio histopatológico se observó balonización de las células en el estrato espinoso.

Este tipo de lesiones corresponden a las causadas por el virus pax del ectima contagioso (14, 23). También se detectaron pústulas focales en el estrato escamoso, áreas focales de infiltración en la epidermis y en la dermis, predominando células polimorfonucleares y en menor proporción linfocitos, células plasmáticas y algunos eosinófilos, acompañados de edema moderado. Estas lesiones se presentan después de que hay invasión por agentes secundarios (11, 15, 23); entre los que en este estudio se encontraron, Staphylococcus aureus y levaduras.

Al microscopio electrónico se identificaron virus pax que medían 290 X 148 nm en promedio, con características morfológicas correspondientes al virus del ectima contagioso descrito por (12).

Los resultados de la prueba de anticuerpos fluorescentes, demostraron que el antígeno viral se encontraba en las células de la piel de los corderos que fueron presentados para diagnóstico.



## CONCLUSION

Con base en la historia clínica, los signos clínicos, las lesiones macroscópicas observadas, la reproducción de la enfermedad, las alteraciones histológicas, la observación del virus al microscopio electrónico, con su morfología y dimensiones características y los resultados positivos a la prueba de anticuerpos fluorescentes, se concluye que utilizando técnicas específicas de laboratorio, se ha identificado en Tula, Hidalgo y por lo tanto por primera vez en México, la enfermedad producida por el virus del ectima contagioso de los borregos.

## RESUMEN

Se estudió un rebaño de raza Suffolk, que de acuerdo con los informes proporcionados por los ganaderos procedían de San Angelo, Texas, E.U.A., desembarcado a principios de enero de 1979, en Tula, Hidalgo, México, en donde llegaron y permanecieron en buenas condiciones. Había 50 machos y 1,200 hembras, todas gestantes, faltándoles de 1 - 2 meses para parir. Se esperaba que nacieran 1,200 corderos aproximadamente. A fines de febrero de 1979, en los corderos jóvenes se empezaron a presentar signos y lesiones sospechosas de ectima contagioso, con formación de pústulas y costras en los labios, región perioral y paladar. Enfermaron de ectima contagioso aproximadamente 450 corderos y finalmente la mortalidad fue de 900 a consecuencia del ectima, aunado a complicaciones secundarias por debilidad, parasitosis y enfermedades bacterianas. En aproximadamente 50 madres hubo lesiones papulosas y costrosas en la ubre, sin mortalidad. El curso llegó a ser de un mes y a los 3 a 4 meses desapareció el brote. De dos corderos se colectaron lesiones, se hicieron molindas y con estas se inocularon 2 corderos susceptibles, en los que se desarrollaron lesiones típicas que se iniciaron a las 24 horas y eran claras a partir de las 48 horas; de estas nuevas lesiones se colectaron biopsias para darle un segundo pase al virus en otro borrego, en el cual se volvieron a presentar el mismo tipo de lesiones. Al estudio histopatológico de las lesiones, se encontró que las células del estrato espinoso mostraban balonización, en la epidermis había edema moderado y múltiples áreas focales de infiltración de polimorfonucleares, linfocitos, células plasmáticas y algunos eosinó-

filos. Al microscopio electrónico se encontraron virus con la morfología típica de los virus pox. Al hacer la prueba de fluorescencia se encontraron resultados positivos.

Con base en la historia clínica, los signos clínicos, las lesiones macroscópicas observadas, la reproducción de la enfermedad, las alteraciones histológicas, la observación del virus al microscopio electrónico, con su morfología y dimensiones características, y los resultados positivos a la prueba de anticuerpos fluorescentes, se diagnosticó ectima contagioso de los borregos. En distintas regiones de México, se ha informado con anterioridad, la existencia de enfermedades clínicamente parecidas. Sin embargo, no existen publicaciones respaldadas con pruebas específicas de laboratorio, por lo tanto se considera que esta es la primera ocasión en que se demuestra la existencia, en Tula, Hidalgo y por lo tanto en México, del ectima contagioso de los borregos.

Nota: El conjugado utilizado no da reacción cruzada con el virus de la paravaccinia (nódulo de los ordeñadores) y se piensa que tampoco da reacción cruzada con los virus vacunales (Pearson, 1980, comunicación personal).

## BIBLIOGRAFIA .

1. Andrewes, C., 1972, ORF, In: Viruses of Vertebrates, Third Ed. - - Bailliére Tindall, London, pp. 389-390.
2. Blood, D.C. and J.A. Henderson, 1974, Contagious Ecthyma. - - - Veterinary medicine, Fourth Ed. Bailliére Tindall, London, pp. 548-550.
3. Blood, D.A., 1971, Contagious ecthyma in Rocky mountain bighorn - - sheep, J. WILD MANAGE, 35:270-274.
4. Brunner, D.W., J.H. Gillespie, 1970, Ectima Contagioso del Carnero, Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos con especial referencia a etiología, diagnóstico y terapéutica, Tercera Ed. Traducida de la quinta ed. en Inglés. La Prensa Médica Mexicana, pp. 794-797.
5. Cooper, B.S., R.E. Lynch and P.M. Marshall, 1970, An outbreak of contagious pustular dermatitis associated with Dermatophilus congolensis infection, N.Z. Vet. J., 18:199-201.
6. Faizulina, S.I., Ts. Ts. Khanduev, E.D. Imanov, B.N. Gusev and - - E.V. Makarova, 1972, The development of contagious ecthyma virus plaques in cell cultures. Izv Akad Nauk Kirg Ssr, 1:51.
7. Hiepe, T.H., 1972, Ectima contagioso. Dermatitis pustulosa. Enfermedades de la oveja, Ed. Acribia, Zaragoza, pp. 109-113.
8. Hungerford, T.G., 1970, Scabby Mouth, Diseases of Livestock Seventh Ed. Angus and Robertson London, pp. 96-99.
9. Joensen, Hogni Debes and Buchardt Bloch, 1974, Human ecthyma contagiosum (orf) in the Faroe Islands: An epidemiological and electron microscopic study. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. Microbiol. Immunol. 82 (3): 311-317.
10. Jubb, K.V.F., and P.C. Kennedy, 1970, Contagious Ecthyma. Pathology of Domestic Animals, Second Edition, Academic press, New York. Vol. 2, pp. 595-597.
11. Kerry, J.B., D.G. Powell, 1971, The Vaccination of Young Lambs - - against Contagious Pustular Dermatitis, Vet. Rec. pp. 671-672.
12. Kluge, J.P., N.F. Cheville, T.M. Peery, 1972, Ultrastructural Studies of Contagious Ecthyma in Sheep, Am. J. Vet. Res. 33:1191-1200.

13. Manninger, R. y J. Mocsy, 1968, Dermatitis pustulosa necrosante contagiosa de los ovinos y caprinos. *Patología y Terapéutica Especiales de los Animales Domésticos*, Segunda Ed. Labor, pp. 415-419.
14. Marsh, H., 1965, Contagious Ecthyma. *Newsom's Sheep Diseases*. - - Third Edition. The Williams and Wilkins Co., pp. 121-127.
15. Morales, G.A., and H.J. Van Kruiningen, 1971, Contagious Ovine - Ecthyma with Primary Lesions of Rumen and Concurrent Phycomycosis. - *Am. J. Vet. Res.*, 32:163-166.
16. Poulain, Joelle, J.M. Gourreau and A. Dautigny, 1972, Contagious - pustular dermatitis of sheep: Neutralizing antibody. *Ann Rech. Vet.* 3 (4): 571-579.
17. Ramlayar H., 1973, Etude sur possibilite du controle de l'ecthyma contagieux a l'aide d' un virus vaccin prepare sur cultures, *Arch. Inst. - Razi*, 25:5-7.
18. Rosales, L.F., y A. Loarca, 1971, Ectima contagioso espontáneo y -- experimental en Guatemala. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. San Carlos*. 3 (1): 29-32.
19. Roslyakov, A.A., 1972, Comparative Ultrastructure of viruses of camel pox-like diseases of camels ("auzdyk") and contagious ecthyma of sheep. *Vopr. virusol* 17 (1):26-30.
20. Runnells, R.A., W.S. Monlux, A.W. Monlux, 1965, Contagious - -- ecthyma, *Principles of Veterinary Pathology*, Seventh Edition, The Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 892-895.
21. Samuel, W.M., G.A. Chalmers, J.G. Stelfox, A. Lowen, A. and - J.J. Thmsem 1975, Contagious Ecthyma in Bighorn Sheep and Mountain Goat in Western Canada. *Journal of Wildlife Disease*, 11: pp. 26-31.
22. Sawhney, A.N. and N. Spasova, 1973, Propagation of Ecthyma contagiosum virus in avian tissues. Electron Microscopic evidence of virus multiplication. *Indian J. Exp. Biol.* 11 (3):251-252.
23. Smith, H.A., and T.C. Jones, 1961, Contagious Ovine Ecthyma. *Veterinary Pathology*, Second Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, p. 302.
24. Wilkinson, G.T., J. Prydie and J. Scarnell, 1970, Possible "Orf" - - (Contagious Pustular Dermatitis, Contagious Ecthyma of Sheep) Infection in the dog. *Vet. Rec.* 87:766-767.