

Universidad Nacional Autónoma de México
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



ECTIMA CONTAGIOSO EN CULTIVOS CELULARES
PRIMARIOS DE OVINOS Y CAPRINOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:

JORGE TORRES MARTINEZ

Asesor: Dr. JORGE LUIS TORTORA PEREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

- I INDICE.
- II INTRODUCCION.
- III OBJETIVO.
- IV REVISION BIBLIOGRAFICA
- V MATERIAL Y METODOS.
- VI RESULTADOS.
- VII DISCUSION.
- VIII BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION.

El ectima contagioso es una enfermedad viral, causada por un Parapox virus, conocida como dermatitis contagiosa, periestomatitis pustular contagiosa, dermatitis necrosante contagiosa de los ovinos y caprinos, y ORF; que afecta a diferentes especies en forma natural y experimental (2,5,-12,25 y 32).

Las especies más severamente afectadas en forma natural son los ovinos y caprinos, principalmente los animales jóvenes también afecta a venados, perros y al hombre. En el hombre y en el perro cuando están en contacto con rebaños infectados o con materiales contaminados (2,5,7 y 13). Los bovinos y conejos pueden ser infectados en forma experimental (2 y 30).

En los pequeños ruminantes la enfermedad se caracteriza por producir pústulas y costras gruesas que se localizan en los labios, paladar, encías, rodetes dentales y lengua; en la piel que rodea a las ventanas nasales, ojos y pesuñas. Las hembras adultas pueden presentar lesiones en las tetas, ulceración, hinchazón y dolor en los labios vulvares, y flujo vaginal mucoso o purulento cuando hay contaminación bacteriana (30).

En el caso de los machos adultos a causa de la infección, pueden producirse úlceras en la piel del prepucio, con tumefacción en la abertura prepucial y en el pene, así

como lesiones en el escroto y acumulación de líquido en el saco escrotal (3,7,8,9,22 y 28) .

El ectima contagioso es una enfermedad de distribución mundial y ha sido diagnosticada clínicamente en todas las regiones de la República Mexicana donde existen explotaciones de ovinos y caprinos. Recientemente su presencia ha sido confirmada por inmunofluorescencia y microscopía electrónica, por Rodríguez, B. y col. (2 y 29) .

No existe información sobre la importancia económica de esta enfermedad, pero su elevada morbilidad, asociada al hecho de que afecta en forma más severa a los animales jóvenes, hace factible que las pérdidas sean cuantiosas (2 y 7) .

El reporte antes mencionado de Rodríguez, B. y col. (29) , señala que de 1200 corderos murieron 900 por complicaciones secundarias producidas por bacterias, principalmente a nivel del tracto respiratorio y digestivo.

Los animales afectados, en condiciones normales se recuperan en el término de 2 a 4 semanas, sin que quede cicatriz alguna; sin embargo durante ese período, en los animales jóvenes hay lesiones periorales que no les permiten mamar ni ingerir alimentos, lesiones que pueden extenderse a todo el tracto digestivo y respiratorio existiendo a causa de esto, retraso en el crecimiento y mortalidad a consecuencia de infecciones secundarias y/o miasis cutáneas por lo que el curso de la enfermedad puede ser mas --

largo (2,7,22,25,28 y 29) .

Se han reportado además casos excepcionales en que se produce invasión sistémica con mortalidad de 25 a 75 % -- (30) . La morbilidad y mortalidad son mucho más altas en los animales jóvenes debido a que requieren de mayores cuidados, y son más fácilmente atacados por infecciones secundarias, aunado ésto a la imposibilidad de mamar, ya sea -- por lesiones propias o porque las hembras que presentan -- lesiones en las tetas, no permiten que los corderos mamen-- (25 y 30) .

Algunos autores reportan que los animales recuperados de la enfermedad quedan como portadores sanos durante varias semanas después de la infección y que a partir de -- éstos, los animales susceptibles pueden infectarse (24), -- otros mencionan que la infección se produce por contacto-- directo con animales afectados y objetos inanimados, cuando los animales susceptibles presentan escoriaciones y/o-- fisuras en la piel (2,3,7,22 y 30) .

En esta enfermedad, uno de los aspectos de mayor inportancia e interés es el hecho de que no se cuenta con -- medidas profilácticas adecuadas para el control y erradicación de la enfermedad; actualmente los programas de vacunación solo pueden fundamentarse en una técnica de escarificación , con los riesgos y consecuencias que esta metodología supone (25) .

Por otra parte, existe información escasa y contra
dicatoria respecto a la existencia de diferentes serotipos
o biotipos del virus (3,5,14 y 26) .

OBJETIVO .

Considerando la escasa información respecto a la ---
existencia de serotipos o biotipos del virus, el objeto -
del presente trabajo; es aportar información al respecto.
Ensayando el virus en cultivos celulares primarios, inocu
lando a conejos y borregos, y verificando su comportamiento
contra un suero hiperinmune, y con técnicas de inmuno
fluorescencia.

REVISION BIBLIOGRAFICA.

ECTIMA CONTAGIOSO.

El ectima contagioso es una enfermedad infecto-contagiosa de los borregos y cabras causada por un Parapox virus, caracterizada por la formación de pápulas, vesículas, pústulas y costras en la piel de los labios y otras regiones del cuerpo. Es de distribución mundial y aunque no se tienen cálculos exactos se sabe que es causa de cuantiosas pérdidas económicas, las cuales en muchos casos ascienden a cientos de miles de dólares (2 y 25) .

Esta enfermedad recibe diferentes nombres dependiendo del país de que se trate: En Inglaterra, se le conoce como dermatitis pustular contagiosa; en Francia como estomatitis pustular contagiosa; en Escocia como ORF; en Australia como boca costrosa; en U.S.A. algunos de los nombres que recibe son : Ulceración de labios y piernas, boca ulcerada , dermatitis pustular infecciosa y dermatitis vesiculopustular contagiosa; en Canadá se le conoce como boca adolorida, dermatitis pustular contagiosa, boca costrosa, dermatitis labial infecciosa y ORF; en México se le conoce comunmente como ectima contagioso (29,30,32 y 35) .

CARACTERISTICAS DEL VIRUS.

Es un virus de la familia Poxvirus que por sus características morfológicas y biológicas pertenece al género -

de los Parapoxvirus en el que se incluyen además, el virus de la pseudoviruela y el de la estomatitis papular bovina - (15) . Es un virus DNA de doble banda de ácido nucleico, - de difícil filtración (1,2,11 y 25) .

Al igual que los virus de su grupo posee 2 formas: La "M" (fosfotungstato impermeable) con superficie acanalada - y la forma "C" (fosfotungstato permeable) que es ligeramente más grande y con superficie lisa; ambas con envoltura - compleja, envolviendo a un nucleoide (16) .

Difiere de los demás miembros de su grupo en que es - más pequeño pero contiene aproximadamente la misma cantidad de DNA (3.2 %) y la misma proporción de proteína -- (14.7 %), (16) .

Tiene forma de paralelepípedo o elipsoide y mide de - 200 a 300 μ , aunque otros autores mencionan que tiene un tamaño entre 158 y 252 μ , (18 y 30) . En la superficie - presenta líneas entrecruzadas dadas por fibras tubulares, que se hacen especialmente aparentes cuando se les aplica - tinción negativa de fosfotungstato de sodio (18) .

Es un virus altamente resistente a la desecación y a - las condiciones climáticas adversas; se ha observado que - el virus en las costras puede permanecer viable en tierra, aún en veranos muy secos y calientes como son los de Texas , por períodos hasta de 60 días, lo cual demuestra su gran resistencia. Es inactivado por la luz y los rayos solares;

el fenol, cloroformo, los álcalis y ácidos también lo inac
tivan (2,3 y 30) .

En una alacena a temperatura ambiente, en frascos ta
pados con torundas de algodón de lana y tapones de corcho -
el virus conservó su infectividad por 15 y 1/2 años (7).

El virus es destruido a una temperatura de 58 a 59°C -
por 30 minutos y retiene su virulencia a 55°C durante 20 -
minutos (2). Puede ser aislado en cultivos celulares, y se
ha observado que crece con más facilidad en cultivos prima
rios que en líneas celulares (12 y 19). En lo que respecta
al cultivo en embrión de pollo , algunos reportes indican -
resultados satisfactorios mientras que otros señalan resul
tados totalmente negativos (12 y 30) .

ESPECIES AFECTADAS.

Se acepta sin discusión que las especies más severa
mente afectadas en forma natural son los ovinos y caprinos
; y hay evidencia de la transmisión de la enfermedad de -
animales domésticos a animales salvajes tales como renos y
cabras de monte, por medio de las fuentes artificiales de
sal que se utilizan en los parques naturales o por utili
zar los mismos pastizales (2,13,14 y 32) ; aunque se seña
lan casos de brotes de la enfermedad en animales salvajes -
sin que hubiera contacto aparente con animales u objetos -
infectados, lo cual para algunos sugiere la existencia de -

variedades específicas del virus para las diferentes especies (8,13 y 14) .

El hombre también es susceptible a este virus siempre y cuando tenga contacto directo con animales enfermos o -- con material contaminado (3,7,11 y 12) .

En especies tales como el conejo, el perro y los bovinos, hay discrepancias en cuanto a la susceptibilidad al virus, ya que hay reportes a nivel experimental en que se niega su infección (2,5,16 y 36), mientras que otros autores como Aynaud señalan haber logrado la infección en bovinos por inoculación intracutánea (2); y además se reporta un caso de infección natural en un perro pastor (39) .

Las especies que se consideran refractarias a la infección a nivel experimental son : equinos, cerdos, cobayos, hamsters y ratones (2 y 36) .

LESIONES.

El virus tarda aproximadamente 2 a 4 semanas en manifestar sus efectos cuando penetra a los animales susceptibles en forma natural, mientras que cuando se inocula experimentalmente el período de incubación es de solo 2 a 5 días.

Los primeros cambios que se aprecian clínicamente son : tumefacción e inflamación de los labios y paralelamente a estos cambios se desarrollan pápulas que en el término aproximado de 3 días evolucionan a vesículas, las cuales a las 24 horas se revelan como pústulas, formadas por una delgada capa de epidermis y llenas con un líquido blanco amarillento, que se revientan en un lapso de 24 a 48 horas dejando superficies ulceradas que secan gradualmente y en 11 a 20 días se forman unas costras delgadas y firmemente adheridas, las cuales posteriormente se secan y caen. Tomando en cuenta que las pústulas no se forman y revientan al mismo tiempo, todo el proceso dura entre 22 a 32 días, durante los cuales los animales evitan mamar o comer por los dolores que les causan las lesiones, que en el mejor de los casos afectan sólo los labios, comisuras labiales, piel que rodea a las ventanas nasales y morro, ya que en casos severos las lesiones se extienden a otras partes del cuerpo como se describirá mas adelante; y a consecuencia de esto pierden peso y condición en un período crítico de -

su vida (entre 3 y 6 meses de edad) que es cuando generalmente son afectados los animales (2, 7 y 12) .

Aunado a ésto pueden producirse complicaciones secundarias, ya sea por bacterias o por infestación de las heridas con larvas de mosca (Cochliomyia macellaria) , que se constituyen en un verdadero problema aproximadamente al -- quinto día después de que empieza la enfermedad y son en - realidad la causa de la mortalidad más que la enfermedad - en sí misma (2,22,28 y 30).

Como se mencionó anteriormente existen casos muy severos en los cuales se manifiesta un marcado edema de los - labios y de los espacios intermandibulares; severa dermatitis exudativa y proliferativa en los labios, alrededor de las comisuras bucales, en la cara y el morro; así como erosiones irregulares lineales de 0.5 a 1.0 cm. por 0.2 a 0.5 cm. en la mucosa gingival y cojinetes dentales; lesiones - abultadas gris amarillentas en el dorso de la lengua y en - el paladar duro (3) .

Ocasionalmente algunos borregos presentan lesiones - costrosas alrededor de los ojos y descarga nasal mucopurulenta. Las lesiones se llegan a extender aparte de la mucosa bucal a la mucosa nasal, orejas y extremidades, afectando el espacio interdigital y rodete coronario. En este último caso se conoce como forma podal (25) .

Además se reportan casos de necropsias en que las le siones se extienden a faringe y esófago con ocasionales - complicaciones de la mucosa del retículo, pliegues del -- omaso, mucosa intestinal y pulmones (2).

En animales adultos es muy frecuente la forma genital ; en hembras provoca lesiones en las tetas, ulceración, - hinchazón y dolor en los labios vulvares, y flujo vaginal - mucoso o purulento cuando hay contaminación bacteriana. En los machos hay úlceras en la piel del prepucio, tumefac ción en la abertura prepucial y en el pene, lesiones en - escroto y acumulación de líquido en saco escrotal (7,22,30)

En venados y ocasionalmente en pequeños rumiantes se - observan lesiones de aspecto papilomatoso (13 y 14) .

DIAGNOSTICO.

Hasta hace relativamente poco tiempo, el diagnóstico se realizaba en base a signos clínicos y la observación de la evolución de las lesiones en los animales sospechosos (9, 29 y 32). Lógicamente esto se debía tomar con reserva ya que existen otras enfermedades con signos clínicos similares tales como: virus Pox de cabra, virus Pox de borregos, lengua azul, peste de los pequeños rumiantes(exótica) y en un momento dado la fotosensibilización podría llegar a dar signos cínicos parecidos (3,7,23,28 y 33).

Actualmente se cuenta con métodos de diagnóstico con amplio margen de seguridad tales como: pruebas de neutralización o fijación de complemento, reproducción experimental de la enfermedad en animales susceptibles (conejo), aislamiento del virus en cultivos celulares y observación en éstos de anticuerpos fluorescentes, histopatología y observación del virus al microscopio electrónico (6,8,12, 13,14, y 19).

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL.

Las lesiones de ectima contagioso son lo suficiente mente características en los casos típicos como para establecer diagnóstico, solo pueden confundirse con casos de fotosensibilización (7). Los animales afectados son principalmente los jóvenes y los porcentajes de morbilidad son

elevados con baja mortalidad (menos del 5%). Generalmente se señala la necesidad de diferenciar con viruela ovina y caprina, pero éstos son procesos generalizados y con lesiones muy características y distintas del ectima contagioso, la mortalidad es además elevada en la viruela ovina y caprina. Lo mismo podría señalarse para lengua azul.

También se debe hacer diagnóstico diferencial con sarna (mediante un raspado), y peste de los pequeños ruminantes (exótica) (2,7 y 23).

CONTROL Y PROFILAXIS.

Como se mencionó anteriormente, no existen medidas profilácticas adecuadas para el control y erradicación de la enfermedad; actualmente se llevan a cabo programas de vacunación que se fundamentan en una técnica de escarificación, que consiste en raspar una porción de piel sin pelo y aplicar sobre la zona escarificada una suspensión del virus virulento (de campo); dicha suspensión puede ser comercial o una vacuna autógena preparada de una molienda de costras suspendidas en solución salina y mezcladas con glicerina en partes iguales, con o sin adición de antibióticos, aunque se recomienda adicionarlos para evitar al máximo infecciones secundarias. Las vacunas comerciales se obtienen a partir de costras, infectando cultivos celulares y posteriormente se liofilizan (25).

Sin embargo tanto en las vacunas autógenas como en -

Las vacunas comerciales existe discrepancia en cuanto a su infectividad pues mientras que algunos autores describen - vacunas satisfactorias (7), otros reportan fallas ante una posterior exposición al virus virulento (2 y 3), y se men_ cionan riesgos de introducir microorganismos patógenos con el método de escarificación, así como la incapacidad de - prevenir la presentación de lesiones en el punto de escari_ ficación (25).

Hay diferentes opiniones en cuanto a la duración de - la inmunidad pos-vacunal; según algunos dura 5 a 8 meses - mientras que otros señalan hasta 2 años. No hay transmi_ sión de anticuerpos por la leche materna(2).

No hay tratamiento específico para evitar complicacio_ nes secundarias, se han usado antibiótico y antisépticos _ locales. El uso de aceite de pino alquitranado, que posee - efecto germicida combinado con aceite suave que tiende a a_ blandar las costras y proteger de las moscas, ha dado bue_ nos resultados (2).

MATERIAL Y METODOS.

VIRUS.

Para ensayar el crecimiento en cultivos primarios de piel y riñon fetal de ovino y caprino del virus de ectima contagioso, se utilizaron costras provenientes de 4 casos clínicos de diferentes zonas geográficas de México, dos de origen ovino y dos de origen caprino. En lo que se refiere a las muestras (costras) de ovino, ambas se obtuvieron en el Estado de México aunque de diferentes explotaciones y en fechas distintas, julio de 1979 y marzo de 1981 respectivamente; de las muestras (costras) de cabra, una se obtuvo en el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (INIP) de Acapulco Guerrero y otra en el rastro de Tlanepantla, Estado de México de una cabra que probablemente provenía del Estado de Guanajuato, ambas en agosto de 1980.

INOCULO INFECTANTE.

Las costras fueron pesadas e identificadas, las de ovino con los números: 3 (0.18 g.) y 10 (0.23 g.); y las de caprino con los números: 8 (0.28 g.) y 9 (0.34 g.) respectivamente. Se miceraron por separado en condiciones de esterilidad (en una unidad de flujo laminar), agregando en cada caso: 20 ml. de medio mínimo esencial (MEM) *(1), con 2% de antibioticos (penicilina G sódica cristalizada de 200 UI/ml. mezclada al 50% con estreptomocina "S" de 200 microgramos/ml.) *(2), y 0.5% de suero fetal bovino *(3).

Se centrifugaron a 3000 rpm 10' y se colectaron los sobrenadantes, los cuales fueron almacenados en un congelador - REVCO a -70°C para su posterior utilización.

CULTIVOS PRIMARIOS.

En el rastro de Tlanepantla, Estado de México, se obtuvieron fetos de ovinos y de caprinos de aproximadamente- 20 a 25 cm. de largo (de la base de la cola a la nuca).

En todos los casos los fetos fueron colectados inmediatamente después de sacrificada la madre y transportados al laboratorio en frascos estériles con agua mixta esteril (50% de agua destilada y 50% de agua deionizada) adicionada de solución buffer, antibióticos *(4) y fungizoma *(5).

Durante todos los experimentos se trabajó en una unidad de flujo laminar.

De todos los fetos y por separado, se tomaron muestras de piel de la región torácica; y se extrajeron los riñones y previa eliminación de la cápsula se tomó la corteza de los mismos. A los cuatro tipos de tejido, (piel y riñón fetal de cabra y ovino) se les sometió al método de rutina para la obtención de cultivos primarios; maceración, -lavado tripsinización, filtración, centrifugación a 1000 - rpm 10', resuspensión y sembrado en el medio de crecimiento que contenía: suero fetal bovino *(6) 20%, caldo de - - tripticaseína y fosfato (TPB) *(7) 10% , vitaminas *(8) 1% aminoácidos *(9) 1%, NaHCO_3 *(10) en solución al 7.5%, y -

medio mínimo esencial (MEM) *(1) para aforar a la cantidad deseada. Se probó con todos y cada uno de los tipos de tejidos 3 diferentes niveles de pH: 7.3 (0.65% de NaHCO_3 en solución al 7.5%), pH 7.5% (1.0% de NaHCO_3 en sol. al 7.5%), y pH 7.7 (1.5% de NaHCO_3 en sol. al 7.5%).

En todos los casos en que hubo resultados positivos se hicieron pases sucesivos con el fin de mantener siempre un stock de cada tipo celular y a la vez contar con monoes-tratos para las diferentes fases de los experimentos.

*(1).- Marca Gibco, cat. N° 410-1500

*(2).- Marca Lakeside.

*(3).- Marca Gibco, cat. N° 200-6140

*(4).- Penicilina G sódica cristalizada 200 UI/ml y estreptomicina "S" 200 mg./ml. mezcladas al 50%. Marca Lakeside.

*(5).- Marca Gibco. 5 UI/ml. cat. 600-5295

*(6).- Marca Gibco. cat. N° 200-6140

*(7).- Marca Bioxon de México. cat. N° 225-1

*(8).- Marca Microlab.

*(9).- Grand Island Biological Company. cat. N° -
320-1140

*(10).- Marca J.T. Baker. cat. N° 706-U99

INFECCION DE PLACAS PARA MICROPRUEBA.

A partir de monoestratos crecidos en botellas medianas de plástico de 30 cc. (25 cm²) +(1), se prepararon replicaciones de los cuatro tipos de células de III y IV pase en placas para microprueba +(2). Se tripsinizaron los monoestratos de las botellas, una vez desprendidas las células se resuspendieron en el medio de crecimiento descrito anteriormente, depositando .05 ml. de ésta suspensión en cada foseta de las placas para microprueba. Se utilizaron placas para microprueba de 96 fosetas .

Se descongeló el inóculo infectante y a partir de éste se prepararon diluciones logarítmicas desde 10¹ hasta 10⁶, utilizando medio de mantenimiento. Se utilizó como medio de mantenimiento la misma composición que para el medio de crecimiento, pero con solo 2% de suero fetal bovino. Las diluciones fueron probadas sobre los cuatro sistemas celulares crecidos en las placas para microprueba, enfrentando en cada caso dos fosetas por cada dilución de virus según el esquema N° 1.

+(1).- Marca Falcon. cat. N° 10-126-2B

+(2).- Marca Falcon. cat. N° 3502- 10

ESQUEMA N° 1.

ILUSTRACION DEL ORDENAMIENTO SEGUIDO EN LA
INFECCION DE LAS PLACAS PARA MICROPRUEBA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
B	⊗		10 ¹	10 ¹								⊗
C	⊗		10 ²	10 ²								⊗
D	⊗		10 ³	10 ³								⊗
E	⊗		10 ⁴	10 ⁴								⊗
F	⊗		10 ⁵	10 ⁵								⊗
G	⊗		10 ⁶	10 ⁶								⊗
H	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗

VIRUS VIRUS VIRUS VIRUS
 3 8 9 10

2 y 11 .- Células control, no infectadas.

10^x.- Diluciones a las que se usaron los virus.

 .- No se usaron.

La infección se realizó sobre monoestratos confluentes en un 60 a 80%.

Para llevar a cabo la infección: una vez que se alcanzó la confluencia deseada en las placas para microprueba, se decantó el medio de crecimiento y en cada foseta se depositaron .05 ml. de las diluciones antes mencionadas, dejándose el inóculo infectante en forma permanente.

En este diseño se pueden considerar como absolutamente iguales todas las fosetas, dado que incluso se eliminaron en todos los casos las fosetas de la periferia, por haberse observado en más de una oportunidad desecación o crecimiento celular irregular en las mismas.

Cada virus fue ensayado sobre cuatro microplacas de las mismas células (replicaciones), y para cada tipo celular diferente, siempre con el mismo tipo de distribución señalado en el esquema N° 1.

DISEÑO ESTADÍSTICO.

Dados estos elementos, se puede considerar que el ensayo sigue las características de un diseño al azar, donde dos columnas por microplaca de un determinado tipo celular son una unidad experimental (cuatro en total por cuatro replicaciones) sobre la que se aplican a su vez cuatro tratamientos, (uno por cada tipo viral ensayado).

Se combinaron estas posibilidades en un diseño factorial 4 X 4, siendo el primer factor el tipo de célula y el segundo factor el tipo de virus.

El primer factor tiene como variantes la especie de origen de las células (ovino y caprino) y el órgano de extracción (piel y riñón), dando los cuatro niveles previamente mencionados. El segundo factor tiene como niveles las cuatro fuentes de virus.

INFECCION DE TUBOS DE LEIGHTON.

Se cultivaron monoestratos de los cuatro tipos celulares (piel y riñón fetal de cabra y ovino) en tubos de Leighton (Marca Falcon. cat. N° 3505-C81).

En dichos tubos previamente al sembrado de las células, se introdujo una laminilla cubreobjeto, con el fin de que el monoestrato se formara sobre la misma, se siguió el mismo procedimiento señalado en las placas para microprueba, depositando en éste caso 0.8 ml. por tubo, de la suspensión de células.

Se prepararon 20 tubos de Leighton de cada tipo celular por cada virus probado, infectando dos tubos por cada dilución logarítmica de los cuatro virus ensayados, dejando 2 o 3 tubos de cada tipo celular como controles.

La infección se llevó a cabo decantando el medio de crecimiento y depositando .05 ml. de medio infectante por tubo, se incubaron a 37°C durante una hora, (moviendo los tubos aproximadamente cada 15' para lograr una infección uniforme) y posteriormente se recolectaron los sobrenadantes de todos los tubos agregando a cada tubo 1.0 ml. de -

medio de mantenimiento y se mantuvieron en estufa de CO₂ a 37° C.

Al tercer día de la infección, previa observación se fijaron todos los monoestratos de los tubos de Leighton; - la mitad en formol, con el fin de observar mediante coloración con HE (hematoxilina eosina) los efectos citopáticos producidos; y el resto de los tubos se fijó en acetona para observar el antígeno en el microscopio de fluorescencia (marca Zeiss West Germany, equipado con filtros barrera, filtro excitador, y el sistema de iluminación con un condensador cardioida de campo oscuro). Se colectaron los sobrenadantes de los tubos con efectos citopáticos.

SUERO HIPERINMUNE.

Se ensayó la capacidad para inhibir el efecto citopático de un suero hiperinmune de conejo, preparado previamente por el asesor mediante inoculaciones subcutáneas en conejos (35), una por semana durante 3 meses de un liofilizado destras de ectima contagioso obtenida en un brote de caprinos en el Estado de Baja California Sur. Se ensayaron diluciones logarítmicas de 10¹ a 10⁶ del suero hiperinmune sobre placas para microprueba infectadas con los cuatro virus a dilución de 10³, ya que en dicha dilución se observó efecto citopático para todos los virus ensayados.

INFECCION EN BORREGOS.

Con los sobrenadantes colectados de los tubos de Leighton se inocularon por escarificación en la parte interna del muslo cuatro borregos susceptibles (carecían de antecedentes de contacto con la enfermedad y habían permanecido por 4 años en los corrales de la FESC sin reporte alguno de dicha enfermedad), dos con el virus 8 (cabra del rastro de Tlanepantla, y dos con el virus 3 (ovino del Estado de México); a dos borregos más se les hizo la escarificación sin infectarlos, a manera de controles. Cuadro 1.

INFECCION EN CONEJOS.

Ocho conejos susceptibles se inocularon con macerado de costras por escarificación en el labio superior; dos conejos por cada uno de los virus ensayados, y a otros dos más se les hizo la escarificación sin infectarlos, a manera de controles. Cuadro 2.

CONJUGADO FLUORESCENTE.

La mitad de los monoestratos obtenidos en los tubos de Leighton infectados, previo lavado con PBS se fijaron en acetona y se tiñeron con un conjugado de anticuerpos fluorescentes contra ectima contagioso (procedente del National Animal Disease Center de Ames Iowa, proporcionado amablemente por el Doctor Howard Cutlip).

Se incubaron a 37° C 30' y se lavaron mediante tres-
pases por PBS, y una vez secos se montaron en glicerina -
para su observación al microscopio de fluorescencia (31).

RESULTADOS.

CULTIVOS PRIMARIOS.

Se obtuvo crecimiento con los cuatro tipos celulares (riñón y piel fetal de ovinos y caprinos) en los tres diferentes niveles de pH: 7.3, 7.5 y 7.7 que contenían 0.65, 1.0 y 1.3% de NaHCO_3 al 7.5% respectivamente; observándose a las 72 horas posteriores al sembrado una confluencia de 60 a 80 % en los cultivos con pH de 7.3, mientras que en los de pH de 7.5 y 7.7 aunque hubo crecimiento, éste fue lento y en forma de focos aislados por lo que fueron eliminados. Estableciendo 7.3 como pH ideal para todos los tipos celulares ensayados. Figura 1.

TITULACION Y ANALISIS ESTADISTICO.

El efecto citopático en las placas para microprueba se presentó a las 48 horas. Se estableció como título de la muestra la mayor dilución del virus que producía efecto citopático, coincidiendo la observación siempre en las dos fosetas, verificándose el título a las 72 horas en todos los casos. En el cuadro N° 3 se resumen los resultados de la titulación en las placas para microprueba.

En el cuadro N° 4 se muestran los resultados del análisis estadístico de los datos contenidos en el cuadro N° 3 los valores de "F" obtenidos, indican la ausencia de diferencias estadísticamente significativas al compararse cada virus con los distintos tipos celulares, (virus X tipo de célula).

En la gráfica N^o 1 , se observa claramente que no hay diferencia significativa al comparar el tipo de virus con el efecto producido por cada uno de ellos en los diferentes tipos celulares.

RESULTADOS DE LA INFECCION EN LOS TUBOS DE LEIGHTON.

Aunque el efecto citopático se hizo evidente a las 48 horas, los monoestratos se fijaron a las 72 horas. (La mitad en formol y la mitad en acetona).

En todos los casos el efecto citopático se caracterizó por desprendimiento de la monocapa, alargamiento y balloonización de las células con vacuolas en las áreas periféricas del citoplasma, dándoles una apariencia esponjosa; presencia de granulaciones citoplásmicas, células con prolongaciones largas y eventual fragmentación. También se observó la presencia de células gigantes de 2 ó 3 núcleos con elevada relación núcleo plasmática, células crenadas y células con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos. Figuras 2 y 3.

Algunas células aparentemente no son afectadas. Las formas sincitiales descritas por otros autores a los 7 días pos-infección (5 y 36), no fueron observadas por nosotros.

RESULTADOS DE LA PRUEBA CON EL SUERO HIPERINMUNE.

La utilización del suero hiperinmune preparado en conejos con una muestra de costra liofilizada de ectima -

contagioso, colectada de un brote de Baja California Sur, -
bloqueó el efecto citopático en todos los casos al enfren-
tarse a las diluciones 10^3 de las cuatro muestras de virus
ensayadas. Diluciones hasta 10^3 del suero tuvieron efecto-
de bloqueo.

RESULTADO DE LA INFECCION EN BORREGOS.

La enfermedad se logró reproducir en los borregos ino-
culados, presentándose las lesiones características de la-
misma (eritema, pápulas, pústulas y costras) tal como se -
describe en el cuadro N° 1. Las lesiones fueron muy eviden-
tes entre los 6 y 13 días pos-infección, Figura 4. Los -
animales escarificados como control, solo mostraron erite-
ma hasta el 2° día pos-escarificación.

RESULTADO DE LA INFECCION EN CONEJOS.

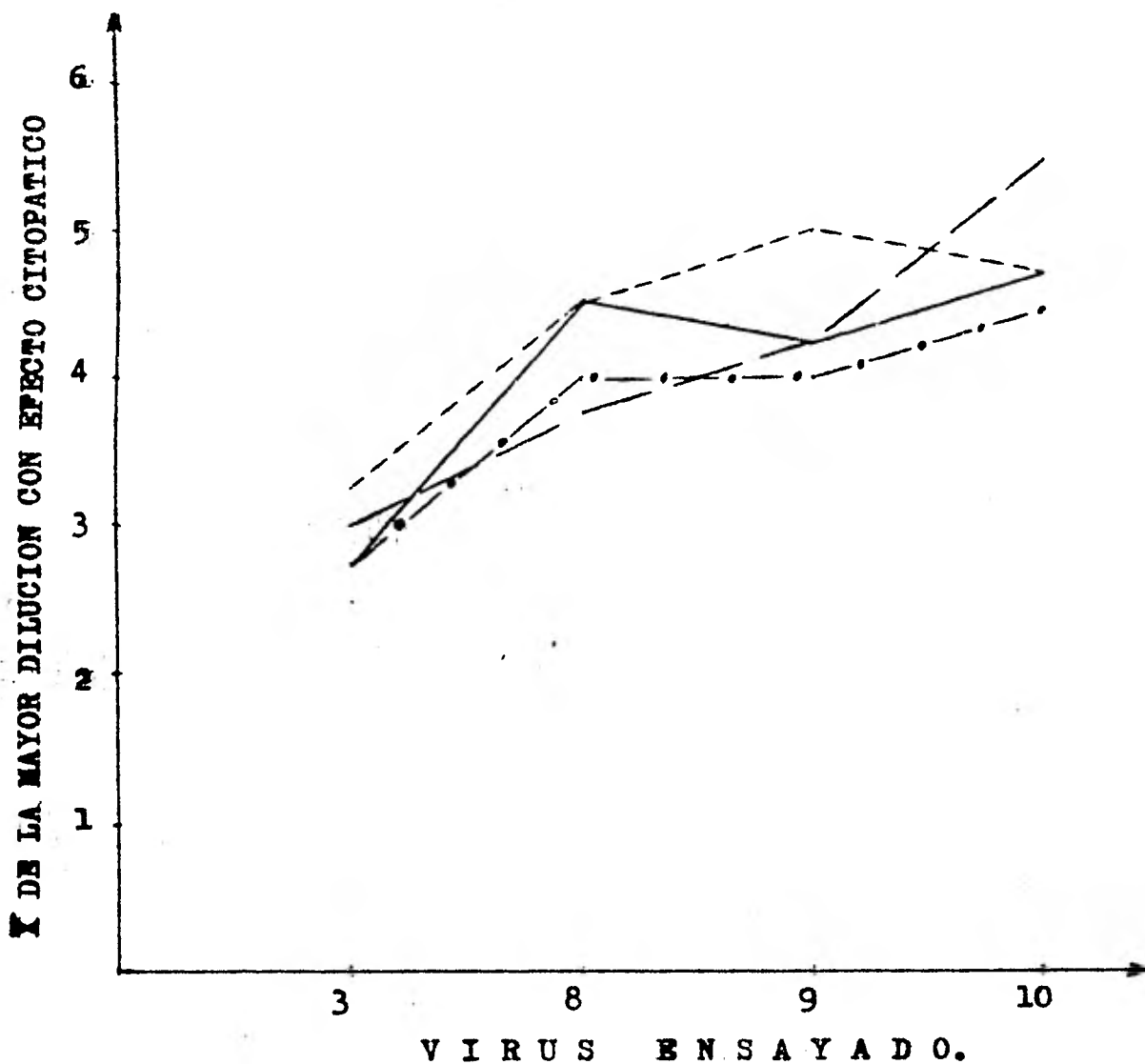
En todos los casos las lesiones presentaron las lesio-
nes clásicas de la enfermedad en un lapso de 4 a 5 días -
pos-infección, caracterizándose por la formación de pápu-
las eritematosas de 0.1 a 0.3 cm. de diámetro en el punto-
de inoculación.

Las lesiones perduraron hasta los 8 días pos-infec-
ción. Figura 5.

RESULTADO DE LA PRUEBA CON EL CONJUGADO FLUORESCENTE.

En la figura N°6 , se pueden apreciar los cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos teñidos con el conjugado fluorescente, así como células lesionadas teñidas homogeneamente por la fluorescencia específica, los núcleos se observan negativos.

GRAFICA N° 1.



GRAFICA COMPARATIVA DEL EFECTO CITOPATICO PRODUCIDO
POR LOS 4 VIRUS ENSAYADOS SOBRE LOS 4 DIFERENTES -
TIPOS CELULARES.

- = piel de borrego.
- = riñón de borrego.
-= piel de cabra.
- . - . = riñón de cabra.

CUADRO N° 1

INFECCION EN BORREGOS.

BORREGO N°	SOBRENADANTE UTILIZADO	L E S I O N O B S E R V A D A				
		ERITEMA	PAPULA	PUSTULA	COSTRA	INTERPRETACION
1	virus 10 de ovino	1°-2° día	3°-4° día	4°-5° día	7° día	+
2	virus 10 de ovino	1°-3° día	3°-4° día	4°-5° día	6° día	+
3	virus 8 de cabra	1°-3° día	3°-4° día	4°-5° día	6° día	+
4	virus 8 de cabra	1°-3° día	3°-4° día	4°-6° día	6° día	+
5	escarificado como control	1° día	-	-	-	-
6	escarificado como control	1° día	-	-	-	-

INFECCION EN CONEJOS.

CONEJO N°	SOBRENADANTE UTILIZADO	L E S I O N O B S E R V A D A			
		ERITEMA	PAPULA	PUSTULA	INTERPRETACION
1	virus 3 de ovino	1°-3° día	3°-4° día	5° día	+
2	virus 3 de ovino	1°-3° día	3°-5° día	5° día	+
3	virus 8 de cabra	1°-2° día	2°-4° día	5° día	+
4	virus 8 de cabra	1°-3° día	3°-4° día	5° día	+
5	virus 9 de cabra	1°-2° día	2°-4° día	5° día	+
6	virus 9 de cabra	1°-2° día	3°-4° día	5° día	+
7	virus 10 de ovino	1°-3° día	3°-4° día	5° día	+
8	virus 10 de ovino	1°-2° día	2°-4° día	5° día	+
9	escarificado como control	1° día	-	-	-
10	escarificado como control	1° día	-	-	-

CUADRO Nº 3

RESULTADOS OBTENIDOS DE LA TITULACION EN LAS PLACAS PARA MICROPRUEBA.

TIPO CELULAR	VIRUS 3 DE OVINO		Σ	\bar{X}	VIRUS 8 DE CABRA		Σ	\bar{X}	VIRUS 9 DE CABRA		Σ	\bar{X}	VIRUS 10 DE OVINO		Σ	\bar{X}	TOTAL		
	10^2	10^3			10^4	10^5			10^4	10^5			10^5	10^6			Σ	\bar{X}	e.e.
Piel de borrego	10^2	10^3	11	2.7	10^4	10^4	18	4.5	10^4	10^3	17	4.2	10^5	10^2	19	4.7	65	4.06	± 0.20
	10^3	10^3			10^5	10^5			10^5	10^6									
Riñón de borrego	10^3	10^3	12	3	10^3	10^3	15	3.7	10^4	10^4	17	4.2	10^6	10^5	22	5.5	66	4.13	± 0.20
	10^3	10^3			10^5	10^4			10^5	10^6									
Piel de cabra	10^3	10^2	13	3.2	10^4	10^4	18	4.5	10^4	10^5	20	5.0	10^5	10^4	19	4.7	70	4.38	± 0.20
	10^4	10^4			10^4	10^6			10^5	10^5									
Riñón de cabra	10^2	10^3	10	2.5	10^4	10^4	16	4.0	10^4	10^4	16	4.0	10^4	10^4	18	4.5	60	3.75	± 0.20
	10^3	10^2			10^4	10^4			10^4	10^4			10^5	10^5					
TOTAL	Σ	46			67				70				78				261		
	\bar{X}	2.88			4.19				4.38				4.88						
	e.e.	± 0.20			± 0.20				± 0.20				± 0.20						

10^x = Títulos obtenidos en las 4 repeticiones de cada tipo celular para cada tipo viral ensayado.

Σ = Sigma.
 \bar{X} = media.

CUADRO No 4

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS
DE LA TITULACION EN LAS PLACAS PARA MICROPRUEBA-
DE ACUERDO AL DISEÑO FACTORIAL 4 X 4.

F. V.	S. C.	g. l.	C.M.	F. c.
TRATAMIENTOS	42.36	15	2.82	4.48 +++
VIRUS	34.92	3	11.64	18.48 +++
TIPO DE CELULA	3.17	3	1.06	1.68 n.s.
VIRUS POR TIPO DE CELULA	4.27	9	0.47	1 n.s.
ERROR	30.25	48	0.63	
TOTAL	72.61	63		

F.V.= fuentes de variación.
S.C.= suma de cuadrados.
g.l.= grados de libertad.
C.M.= cuadrados medios.
F.c.= factor de corrección.
+++ = altamente significativo.
n.s.= no significativo.

DISCUSION.

En este experimento se observó variación en el título para cada virus en todos los tipos celulares. Debe aclararse que la diferencia de título entre los virus probados - puede atribuirse a la presencia de diferente cantidad de - partículas infectantes en cada muestra (costra) más que a distinta susceptibilidad de las células o virulencia de cada virus ensayado, ya que ésta no fue una prueba de carácter cuantitativo sino de carácter cualitativo.

Tal como fue reportado previamente por Kluge, J.P. y Nagington, J. , se verificó la facilidad de crecimiento del virus en cultivos primarios (12 y 19).

Se determinó la infección viral por su efecto citopático en el lapso de 48 a 72 horas pos-infección, lo que concuerda con lo reportado por Hessami, M., Greig, A.S., y Trueblood, M.S. (5, 9, y 36), y los efectos citopáticos se apegan a los hallazgos hechos por los autores antes mencionados, exepctuando la observación de sinsitios.

Existe el antecedente de una falla en el intento de producir suero hiperinmune contra ectima contagioso a partir de inoculación intravenosa de material viral en ovinos así como el éxito al intentarlo en conejos, combinando inoculaciones intravenosas e intramusculares (37). En este caso la producción del suero contra ectima contagioso por inoculaciones subcutáneas sucesivas en conejos resultó efectiva.

Los borregos inoculados manifestaron las lesiones características de la enfermedad a los 7 días de la infección y el curso tuvo una duración de 15 a 20 días, tal como ha sido observado por otros autores, y la diferencia en la intensidad y duración de la enfermedad se puede atribuir a la diferente cantidad de partículas infectantes en los sobrenadantes utilizados o en la variación que hay en la inoculación de un animal a otro atribuible al operador (2,7 y 30).

En el caso de los conejos se logró la manifestación de la infección en 4 a 5 días. en esta especie hay discrepancias de ciertos autores en cuanto a la susceptibilidad al virus (2,5,12 y 35).

Los resultados positivos (manifestación de las lesiones) obtenidos en los conejos con los cuatro virus contra dicen los reportes en los que se señala la no susceptibilidad de esta especie al ectima contagioso(2,5 y 12), y apoyan su uso en el diagnóstico diferencial de la enfermedad por lo menos en los casos en que la muestra resulta positiva en esta especie.

Los resultados obtenidos en estos experimentos, nos indican que los virus ensayados tuvieron básicamente la misma línea de comportamiento, considerando el análisis estadístico en que los valores de "F" señalan la ausencia de diferencias estadísticamente significativas al comparar cada virus con los diferentes tipos celulares.

Si tomamos en cuenta que las cuatro fuentes de virus-ensayadas fueron neutralizadas por un suero obtenido a partir de una quinta fuente de virus, que reaccionaron contra un conjugado fluorescente antiictima contagioso que se produjo en Ames Iowa (EEUU) y que produjeron manifestación de lesiones en conejos, podemos suponer que los virus ensayados se encuentran estrechamente relacionados biológica y serológicamente pese a su diferente origen de especie y geográfico.

Estos resultados son alentadores, considerando que de producirse una vacuna efectiva contra la enfermedad, ésta podría cubrir a los virus actuantes en el país. Sin embargo, se hacen necesarios estudios cuantitativos que verifiquen estas observaciones, así como cubrir un mayor número de muestras en este tipo de ensayos.

BIBLIOGRAFIA.

1. Aguilar Setien, A ; Pastoret, P.P. ; Burtonboy, G. et - Schoenaers, F. Diagnostic de la stomatite papuleuse - bovine (SPB), par examen direct de la salive au mi - croscope électronique. Ann.Med. Vet. 122:555-559.1978
2. Boughton, I.B. and Hardy, W.T. Contagious ecthyma (so - re mouth) of sheep and goats. J. Am. Med. Vet. Ass. - 85:150-178 1934
3. Gardiner, M.R. ; Craig, J. and Nairn, M.E. An unusual - outbreak of contagious ecthyma (scabby mouth) in sheep. Australian Vet. J. 43:163-165 1967
4. Gibbs, E.P.J. and Jhonson, R.H. Differential diagno - sis of virus infections of the bovine teat skin by - electron microscopy. J. Comp. Path. 80:455-463 1970
5. Greig, A.S. Contagious ecthyma of sheep. II-In vitro - cultivation of the virus. Can. J. Comp. Med. - 21:304-308 1957
6. Harkness, J.W.; Scott, A.C. and Herbert C.N. Electron - microscopy in the rapid diagnosis of ORF. Br.Vet.J. - 133:81-87 1977

7. Hart, L. Hayston, J.T.; and Keast J.C. Observations of contagious pustular dermatitis of sheep. Australian-Vet. J. 25:40-45 1949
8. Hebert, D.M. ; Samuel, W.M. and Smith, G.W. Contagious-ecthyma in mountain goat of coastal British Columbia J. Wild dis. 13:135-136 1977
9. Hessani M. , D.A. Keney, L.D. Pearson and Storz. Iso-
lation of parapox viruses from man and animals: Cul-
tivation and cellular changes in bovine fetal spleen
cells. Comp. Immun. Microbiol. Infect. dis., vol 2 -
pp.1-7 1979
10. Kerry, J.B. and Powell D.G. The vaccination of young
lambs against contagious pustular dermatitis. Vet. -
Rec. 88:671-672 1971
11. Kim, J.C.S. and Tarrier, M. Contagious dermatitis of-
sheep in a veterinary student. VM-SAC.72:231-232 1977
12. Kluge J.P. D.V.M., Ph.D.; N.F. Cheville, D.V.M., Ph.D. ;-
T.M. Peery M.D. Ultrastructural studies of contagio-
us ecthyma in sheep. Am.J.Vet.Res., vol.33 N^o 6 pp.11
91-1200 1972

13. Kummeneje, K. and Krogsrud, J. Contagious ecthyma (ORF) IN THE MUSK OX (*Ovibos moschatus*) *Acta Vet. scand.* - 19:461-462 1978
14. Kummeneje K. and Krogsrud, J. Contagious ecthyma (ORF) in reindeer. (*Rangifer T. Tarandus*) *Vet. Rec.* 105 pp 60-61 1979
15. Matthews, R.E.F Classification and nomenclature of vi__ruses .(third report of the international comitee - on taxonomy of viruses) *Intervirology* 12:132-296 - 1979
16. Mitchiner, M.B. The envelope of vaccinia and ORF vi__ruses; an electron citochemical investigation. *J. Gen Virol* 5:211-220 1969
17. Nagington, J. and Wittle, C.H. Human orf isolation of- the virus by tissue culture. *Br. Med. J.* 2:1324-1327 - 1961
18. Nagington, J.; Newton, A.A. and Horne, R.W. The struc__ture of Orf virus. *Virology* 23:461-472 1964

19. Nagington, J.; Tee, G.H. and Smith, J.S. Milkers nodular virus infection in dorset and their similarity to Orf. Nature 208:505-507 1965
20. Nagington, J.; Lauder, I.M. and Smith J.S. Bovine Papular Stomatitis (SPB), pseudocowpox and milkers nodules. Vet. Rec. 81:306-313 1967
21. Nagington, J. The growth of paravaccinia viruses in tissue culture Vet. Rec. 82:477-482 1968
22. Nelson, D.R. Contagious ecthyma in goats J. Am. Med. Vet. Ass. 173 (1); 81-82 1978
23. Obi, T.U. and Gibbs, F.J.P. Orf in sheep and goats in Nigeria. Trop. Anim. Hlth. Prod. 19:233-235 1978
24. Ohman, A.P.S. A note of contagious pustular dermatitis (scabby mouth) of sheep. Australian Vet. J. 17:106-107 1941
25. Pekelder J.J.; Talmon, F.Ph; De Boer M.J. Ecthyma een beken de ziekte waar te weining van bekend is. Een Kort ziekte-over zicht en vaccinati studie. (vit en voor de praktijk) Tijdschr. Diergeenesk del 105:pp 232-239 1980

26. Precausta P. et Castellman. Ecthyma contagieux du -
mouton comparison in vitro de cinq souches Revue -
Med. Vet. 125, 5 697-709 1974

27. Precausta P. ; Ferenc ,Kato and George Vellut. A -
freez dried livig virus vaccine against sheep-pox. -
Comp. Immun. Microbiol.Infect. Dis.,vol 1 pp 305-319
1979

28. Reushaw,H.W. and Agnes G. Dood. Serologic and cross-
immunity studies whith contagious ecthyma and goats-
pox viruses isolated from the western United States-
Archives of virology 56:201-210 1978

29. Rodriguez,B.; Correa, P.; Trigo,F.; Madrid ,J.A y --
Hernández J.P. Ectima contagioso de los borregos en-
México VII Reunión de provincia de microbiologia -
INIP Palo Alto D.F. 1979

30. Rodriguez,B.; Correa, P., Hernández P. Presencia de
ectima contagioso en borregos de Tula Hgo. Méx. -
Tesis. México 1980

31. Rovozzo,C.G.; Burke,N.C. A manual of basic virologi_
cal Techniques. Prentice-hall, Inc, Englwood Cliffs,
N.J. 122-125 1973

32. Samuel, W.M.; Chalmers, G.A.; Stelfox, J.C.; Loewen, A. - and Thomsan, J.J. Contagious ecthyma in bighorn sheep and mountain goat in Western Canada J. Wild Dis. 11: 26-31 1975
33. Singh, I.P.; Pandey, R. and Srivastava, R.N. Sheep - pox; a review. Vet. Bulletin vol. 49 N^o3 pp 145-154 - 1979
34. Soman J.P.; Singh, I.P. Cytopathic and immunogenic studies of sheep pox virus serially cultivated in cell - culture. J. Comp. Path. vol. 90 pp. 99-105 1980
35. Trueblood, M.S.; Chow, T.L. and Griner, L.A. An immunologic study of ulcerative dermatosis and contagious ecthyma. Am. Vet. Res. 24:42-46 1963
36. Trueblood, M.S. and Chow, T.L. Characterization of agents of ulcerative dermatosis and contagious ecthyma. Am. Vet. Res. 24:47-51 1963
37. Trueblood, M.S. Relationship of ovine contagious ecthyma and ulcerative dermatosis. Cornell Vet. 56:531-536 1966

38. Tunnicliff, E.A. Ulcerative dermatosis of sheep.
Am. J. Res. 10:240-249 1949
39. Wilkinson, G.T.; Prydie, J. and Scarnell, J. Possible -
ORF (contagious pustular dermatitis, contagious ec_
thyma of sheep) infection in dog. Vet. Rec. 87:776 -
767 1970