

10
Reg

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores
"CUAUTITLÁN"

"UTILIZACION DE LA INTRADERMOREACCION COMO
SISTEMA DE EVALUACION DE INMUNIDAD Y COMO
PRUEBA DIAGNOSTICA EN ECTIMA CONTAGIOSO"

T E S I S

Que para obtener el título de:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

Noemí Juana Barenas Ramírez

Asesor de la Tesis: Dr. Jorge Luis Tortora Pérez

Cuautitlán, Izcalli, Estado de México

1986



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 está 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.

INDICE:

	Pág.
RESUMEN.....	I
INTRODUCCION	II
I.- ECTIMA CONTAGIOSO	1
1.- Etiología	1
2.- Morbilidad y Mortalidad	7
3.- Transmisión	7
4.- Periodo de Incubación	9
5.- Patogenia	9
6.- Lesiones	10
7.- Histopatología de las lesiones	11
8.- Respuesta Inmune	13
9.- Diagnóstico	16
10.- Tratamiento	19
11.- Control y prevención	20
II.- OBJETIVOS.....	23
III.-MATERIAL Y METODOS	24
IV.- RESULTADOS	28
V.- DISCUSION	40
BIBLIOGRAFIA	44

RESUMEN:

En ectima contagioso (EC) se ha propuesto el uso de la intradermoreacción (IDR) como prueba para la evaluación del estado inmune de animales vacunados y en la detección de posibles portadores.

En un ensayo piloto se observó que macerados de costras de EC inactivados por calor (70°C por dos horas), presentaron mayor actividad antigénica que los inactivados por otros métodos (formalina y luz ultravioleta) al mismo tiempo se ensayo un macerado de costras de pseudoviruela bovina (PVB), inactivado por calor.

En la aplicación de la prueba de IDR a nivel de hato con macerados de costras de EC calentados, se observó que animales menores de 5 meses fueron negativos a la prueba, presentandose la mayoría de los positivos entre los animales de más de 6 meses de edad. Ovinos, en los que no se había observado la enfermedad en forma clínica, pero que se encuentran próximos a un rebaño caprino que si la ha padecido; 19 animales resultaron positivos de 25 inoculados.

Al ser comparados corderos previamente escarificados con no escarificados se observaron diferencias estadísticamente significativas en la presencia de IDR positivas entre los dos grupos, en prueba de χ^2 . Algunos animales adultos (33%) que habían padecido la enfermedad en forma clínica resultaron negativos a la IDR, por lo que no se recomienda el uso de la prueba para evaluar el estado inmune de los animales individualmente. A pesar de esto la prueba puede ser considerada lo suficientemente sensible y útil a nivel de hato.

Biopsias tomadas de respuestas positivas a la IDR, mostraron al examen histopatológico elementos característicos de una reacción de hipersensibilidad retardada. El conteo de partículas virales por tinción negativa en microscopía electrónica de muestras inactivadas por calor a diferentes temperaturas, por distintos tiempos, reveló que al aumentar la temperatura por unidad de tiempo, se reduce marcadamente el número de partículas infectantes, respecto a las no infectantes.

INTRODUCCION:

El ectima contagioso es una enfermedad de ovinos y caprinos, de algunos rumiantes silvestres, que puede ser transmitida al humano por contacto directo con animales infectados (1,2,3). La enfermedad se presenta en forma enzootica en los lugares donde se crían ovejas y cabras, es causada por un parapoxvirus y se caracteriza por la formación de pápulas, vesículas, pústulas y costras en las comisuras labiales y en otras partes del cuerpo (1,2,3,4).

Al parecer la primera descripción de la enfermedad en ovejas fue hecha por Walley en 1890, quien la refiere como dermatitis contagiosa u orf. Más adelante es reportada por otros autores una enfermedad similar en ovejas y cabras, en distintas partes del mundo: Zeller (1920) en el Sureste de Africa; Blanc y cols. (1922) en Grecia; Aynaud y Moussu (1923) en Francia; Lanfranchi (1925) en Italia; Jacotot, (1924) en Annam (Vietnam); Howarth (1929) en California, Schmidt y Hardy (1932) en Texas, (U.S.A.) (2,4).

El término orf es utilizado por Walley (1890), al describir la enfermedad en ovejas, el vocablo puede tener varios significados, mientras el diccionario del Dialecto Inglés (Wright, 1961) describe orf "como una criatura pequeña, de aspecto despreciable", para el antiguo islandés significa "costra o forúnculo" (1,2). En su revisión Peterkin (1937) usa este término al describir la enfermedad en humanos; Robinson y Balassu (1981), usan el nombre de dermatitis pustular contagiosa para referir la enfermedad en ovejas y orf para humanos: Sánchez y cols. (1985), comentan que orf es una enfermedad de la piel, que se presenta en personas que crían ovejas y cabras, o que manejan productos de estos animales (2,3).

Hoare en 1913, usó por primera vez el término de dermatitis pustular contagiosa, más tarde Glover (1928) lo usa al describir la enfermedad en Inglaterra. En otros países es conocida con diferentes nombres: estomatitis pustular contagiosa (Aynaud, 1923) y ectima contagioso (Moussu, 1923) en Francia; orf en Escocia; boca costrosa en Australia y Nueva Zelanda; boca ulcerosa, dermatitis pustular infecciosa y dermatitis vesiculo-pustular contagiosa en Estados Unidos y boquera en Argentina y Uruguay (1,2,5).

En humanos la enfermedad no es severa, las lesiones se localizan principalmente en las manos y tienen una recuperación espontánea en 4 u 8 se-

manas (2,3).

El ectima contagioso (EC) ocurre principalmente en corderos y cabritos sin embargo, es frecuente observarlo en forma leve en animales adultos, probablemente esto se deba a la inmunidad que adquieren después de la infección o por alguna vacunación (Bruner y Gillespie, 1923) (2,6). Lanfranchi (1924), establece que la inmunidad se da tanto en la enfermedad natural como en la experimental, y que desaparece en los 5 u 8 meses posteriores a la infección (4). Los mecanismos de respuesta inmune que operan en EC y su posible utilización en pruebas diagnósticas no han sido completamente establecidos (1). La mayoría de los autores coinciden en señalar que la inmunidad de importancia en EC es posiblemente de tipo celular y no humoral (2,5). Sin embargo, no existían hasta los últimos años comunicaciones del uso de pruebas que demostraran la inmunidad celular, Fastier en comunicación personal a Robinson y Balassu (1981) y Buddle y Pulford (1984), utilizan la prueba de intradermoreacción para evaluar el estado inmune de animales vacunados.

Debido a las lesiones que produce el virus en los labios y boca, los corderos y cabritos dejan de comer, o en el caso de que las ovejas o cabras tengan lesiones en tetas, reusan alimentarlos, ocasionando una disminución en la tasa de crecimiento o bien su muerte por inanición. Por lo regular la mortalidad es baja, si no se presentan infecciones secundarias que puedan ocasionar su aumento, provocando pérdidas cuantiosas en el rebaño (2,4).

La enfermedad ha sido reportada y diagnosticada en todo México, tanto en ovinos como en caprinos. A pesar de ser conocida desde mucho tiempo atrás en su forma clínica, la primera demostración de la existencia del virus, mediante microscopía electrónica, es relativamente reciente (Rodríguez y cols. 1979), no se han reportado casos en humanos y se desconoce su importancia económica (1).

I.- ECTIMA CONTAGIOSO.

1.- ETIOLOGIA.

1.1.- Taxonomía:

El agente etiológico es un virus de la familia Poxviridae; subfamilia Chordopoxvirinae (pox de los vertebrados) 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 estomatitis papular bovina, de interés veterinario (1,2,7).

1.2.- Morfología:

Morfológicamente los miembros del género parapoxvirus son indistinguibles entre sí, sin embargo se pueden diferenciar de otros miembros de la familia poxviridae (2).

Las partículas del virus orf son aproximadamente de 260 x 160 nm (Nagignton y Horne, 1962). En el microscopio electrónico las partículas virales tratadas con fosfotungstato para su observación en tinción negativa, revelan dos formas: tipo 1 o M (mórula), que en su forma característica aparenta un "ovillo de estambre" y el tipo 2 o C (clara), que es permeable al fosfotungstato (2). La proporción de formas M o C en las muestras estudiadas puede variar según los casos, esto se explica como una consecuencia del tratamiento previo que sufren las muestras en su fijación con: glutaraldehído, formalina, por el pH del fosfotungstato de sodio empleado en la tinción; o bien por el uso de varios tratamientos como ultrasonido, urea, éter, hidróxido de potasio, etanol, metanol, cloroformo, 2-mercaptoetanol, lipasa, tripsina, y diferentes combinaciones de estos (Peter y cols. 1964 y Nagignton y cols. 1964) (1,8). Peter y cols, observan el incremento en la forma C o tipo 2 sobre la proporción de la forma 1, mediante el tratamiento de las partículas con solventes orgánicos o buffer alcalinos (pH de 8-12), (2) Robinson y cols. (1982) señalan que el tipo 1 o M corresponde a partículas infectantes, mientras que las de tipo 2 parecen ser viriones dañados, no infectantes, lo que podría explicar su permeabilidad al fosfotungstato (1).

En la forma M, se aprecia como característica la presencia de una estructura filamentososa que rodea a las partículas virales y la confiere, por

su particular disposición, el aspecto de "ovillo" que distingue a este género viral. Las formas M y sus filamentos se observan en mayor proporción y con más claridad cuando la tinción con fosfotungstato se realiza a un pH ácido o neutro, mientras que con pH alcalino (más de 10.5) se favorece la observación de partículas C y en consecuencia la de las estructuras internas de la partícula (Peter y cols.1964 y Nagington y cols1964) (1,8).

1.3.- Propiedades físico-químicas.

1.3.1.- Estructura molecular:

Al igual que los otros parapox, el genoma del virus de ectima esta com puesto por DNA de doble banda, que a diferencia del virus de vaccinia (miem bro de la familia poxviridae; género ortopoxvirus), presenta un peso mole- cular menor (88.8×10^6) y un contenido de G+C de 63%, que resulta ser ma- yor que el contenido en vaccinia (2,9). Mediante varias enzimas, detergen- tes y solventes orgánicos Mitchiner (1969), propone que la estructura ex- terna del virus esta compuesta por una envoltura proteolipídica y la estruc- tura interna esta constituida por subunidades de proteínas, asociadas qui- zás a fosfolipíidos y triglicéridos (2,8)..

1.3.2.- Efecto de la temperatura sobre el virus:

La temperatura juega un importante papel en la infectividad del virus; se ha observado que suspendido en medio de mantenimiento celular, el virus de EC disminuye su título de efecto citopático (ECP) entre 1.5 y 2 de su exponente logarítmico original, si es mantenido a 36°C por una semana. En las mismas condiciones pero a 55 °C el título pasa en una hora y media de 6.3 a menos de 0.7, y a 60°C el título cae en media hora entre 1.5 y 2.0 de exponente logarítmico original (10). En 1924 Aynaud, comunicaba la pér- dida de infectividad para corderos susceptibles de muestras que habían si- do calentadas a 56°C por media hora, (1,2,4,10). Buddle y cols. (1984), pre- paran un inóculo del virus de ectima, sin diluir, inactivandolo con calor (65°C por una hora), para inocularlo a corderos susceptibles por escarifi- cación; a la lectura de los resultados, no hubo desarrollo de lesiones o reacción de alergia en los puntos de inoculación, en cambio a la inocula- ción de virus activo con el mismo procedimiento, se desarrollaron lesiones de ectima; mediante una prueba en cultivo celular no se detecto virus via-

ble después de que fue inactivado por calor, lo que demuestra la pérdida de infectividad del virus con tratamiento (11,12).

Al parecer la congelación a menos 20°C y descongelación a temperatura ambiente, en varios ciclos repetidos, no afecta la infectividad del virus (10).

1.3.3.- Efecto del ultrasonido:

El tratamiento con ultrasonido a 1.5 amperes durante 10 minutos, no inactivo el virus de ectima en la suspensión, por el contrario el título de ECP se incremento hasta 1.5 de su exponente original. Probablemente es to se deba a la liberación del virus intracelular, como resultado de la ruptura de las células, a causa del efecto del ultrasonido (10).

1.3.4.- Efecto de las radiaciones de luz ultravioleta (UV):

La exposición del virus de ectima a las radiaciones de luz UV, con una lámpara de 253.7 mm a 10 cm de distancia por 10, 20, y 30 minutos, inactivan el virus, disminuyendo el título de ECP en forma directamente proporcional a la duración del tiempo de exposición (10).

1.3.5.- Efecto del pH:

Sin especificar en que condiciones Precausta y Stellmann (1974), comunican que el virus pierde de 4 a 6 log. de su ECP 50%, luego de un tratamiento a un pH de 3. El tratamiento del virus con una solución 0.1 N de KOH por 10 minutos, determina marcadas alteraciones en su morfología, mientras que en iguales condiciones, al usar una solución 1N, prácticamente se impide el reconocimiento ultraestructural de las partículas virales(1,8).

1.3.6.- Efecto de solventes lipídicos:

El virus prácticamente no pierde infectividad, después de haber permanecido por 24 horas en una solución al 20% de éter etílico a 4°C, el tratamiento con éter a 20°C por media hora, no modifico significativamente la morfología y el tamaño de las partículas, aunque presento lo que podría considerarse como un ligero hinchamiento, siendo el elemento más significativo el hecho de que dejan de observarse partículas M, luego del tratamiento con éter o acetona (8,13). Tampoco el tetracloruro de carbono o el cloroformo afectan la morfología viral (8), sin embargo el segundo reduce marca

damente el título de ECP (4-6 log.) (Precausta y Stellmann, 1974) (1).

En este caso igual que en el anterior, se ve afectada de manera importante la presencia de partículas M y la infectividad del virus.

1.4.- Resistencia del virus al medio ambiente:

Aynaud (1923) y Theyler (1928), destacan la resistencia del virus con tenido en costras, al medio ambiente, particularmente a la desecación, por más de 1 año (4, 14). Se ha reportado también, que costras conservadas a temperatura ambiente en un armario de laboratorio, mantuvieron su infectividad por más de 15 años (Hart y cols. 1949). Sin embargo la mayor demostración de "longevidad" de virus corresponde a la comunicación de Livingston y Hardy (1960), con costras que fueron desecadas y conservadas a 7°C, resultando infectantes después de 22 años y 8 meses al ser inoculados a corderos susceptibles (1,2).

1.5.- Especies susceptibles:

Aunque orf es considerada una enfermedad principalmente de ovinos y caprinos domésticos, existen reportes de que la enfermedad también se pre senta naturalmente entre otros rumiantes. El ectima a sido reportado en renos, buey almizclero, cabra montés, borrego cimarrón, diferentes especies de ciervos y venados, gamuza y alpacas (1,2). Sin embargo, la enfermedad en gamuzas se considera sería producida por un virus diferente del de ectima ovino y caprino (ectima de la gamuza) (Matthews, 1979) (1). La mayor parte de los reportes en especies silvestres son únicamente descripciones de los cuadros clínicos observados, y en algunos casos las confirmaciones del diagnóstico dejan bastante que desear (1).

En las especies domésticas donde ha sido estudiada la susceptibilidad al virus del ectima, existen ciertas discrepancias en cuanto a la infección natural y a la experimental.

En el caso de los bovinos, se ha reportado que aún pastoreando con caprinos y ovinos enfermos, no se ven infectados con el ectima. Sin embargo Aynaud (1923) y otros, reportan la posibilidad de reproducir lesiones en bovinos en forma experimental (2). Huck (1966), señala la producción de lesiones semejantes a las producidas por estomatitis pustular al inocular sub cutáneamente a becerros en el morro y en la mucosa oral con virus de ectima:

y cita a Morosov y Dalgov (1938), que habrían producido lesiones semejantes a pseudoviruela, al infectar los pezones de las vacas con virus de origen ovino (1).

La susceptibilidad del perro al virus de ectima es muy controvertida, Aynaud (1923), Howarth (1929), Boughton y Hardy (1934), señalan la imposibilidad de reproducir las lesiones de ectima, en perros inoculados experimentalmente mediante escarificación, con macerados de costras. Por el contrario Wilkinson y cols. (1970), reportan en perros de caza alimentados con carne de ovino enfermo, la observación de lesiones sugestivas de ectima, y señalan la presencia de partículas virales (características de ectima), en la observación en microscopía electrónica de las costras obtenidas de los perros enfermos, así como la reproducción de lesiones al inocular un ovino susceptible (2). Leaniz (1971), informa la susceptibilidad del perrro a la infección experimental con macerado de costras obtenidas de casos clínicos de ectima, en ovinos del Uruguay (1). Tórtora (1985)(1), confirma la susceptibilidad del perro al virus de ectima utilizando 19 animales de raza indefinida y de condición física variable, los cuales fueron escarificados en la cara ventral de la base de la cola con diferentes cepas del virus y otros sin inóculo, para ser usados como controles; a los animales positivos se les tomaron muestras para el estudio histopatológico, el cual reveló los mismos elementos que han sido descritos por otros autores en caso de ectima; de las costras obtenidas del experimento se realizó tinción negativa para ser observada al microscopio electrónico, revelando la presencia de partículas virales maduras. Sin embargo el bajo número de animales que desarrollaron lesiones macroscópicamente (4 de 16 animales desafiados), sugiere que la susceptibilidad del perro es relativamente baja y probablemente está asociada a situaciones individuales; por lo mismo no parece recomendable utilizar esta especie con fines de demostración diagnóstica.

Los caballos han sido señalados como susceptibles a la infección experimental con virus de ectima (Kral y Novack, 1913, citado por Beck y Taylor, 1974; Leaniz, 1971)(1). En cambio los intereses de transmitir la enfermedad a cerdos y gatos han resultado negativos, como también los de reproducir lesiones de ectima en animales de laboratorio como ratones y ratas blancas,

ranas, gallinas, palomas, cobayos y hamsters, (Aynaud, 1923) (1,2,4,13). Solo Selbie (1945) reporta la producción de lesiones en cobayos a partir del virus obtenido de un conejo infectado experimentalmente, después de varios fracasos al intentarlo con virus derivado de corderos. Abdussalam (1957), revisa los resultados del Selbie, utilizando incluso material suministrado por éste y concluye que las lesiones de los cobayos, probablemente se debieron a la contaminación de las muestras con Trichophyton gypseum (1,2).

Los resultados en conejos son aun más contradictorios que los de las especies anteriores, muchos investigadores han intentado infectar experimentalmente al conejo obteniendo resultados negativos (2). Abdussalam en 1957, reporta la producción de lesiones de ectima en conejos inoculados por escarificación y vía intradérmica, esta última resulta por lo general con complicaciones bacterianas no deseadas (1,2)., la reproducción de lesiones en conejos fue a través de 18 pases sucesivos en esta especie, indicando que aun después de estos pases el virus conservó virulencia para corderos susceptibles; este autor estima que la susceptibilidad del conejo es de 200 a 2000 veces menor que la del cordero para el virus de ectima, y de muestra que la presencia de lesiones en los conejos depende directamente de la concentración del virus en el inóculo (1).

Los resultados obtenidos por Tórtora (1958), apoyan las observaciones de Abdussalam en cuanto a que se requiere una alta concentración de partículas infectantes en el inóculo para obtener resultados positivos, los que fueron demostrados en cortes de piel de conejo infectados observados en microscopía electrónica; lo que explicaría los resultados negativos reportados por otros autores. Por lo anterior, hay que considerar que si bien un resultado positivo en conejos, puede ser una importante ayuda en la confirmación de un diagnóstico, un resultado negativo debe considerarse con reserva (1).

Bennet y cols. (1944), reportan la susceptibilidad de los monos al virus de ectima (2).

1.6.- Comportamiento del virus en otros sistemas:

El empleo de la membrana corio-alantoidea de embriones de pollo para obtener la multiplicación del virus de ectima contagioso, ha sido ensayado con resultados diversos por diferentes autores. Los investigadores que

han obtenido resultados positivos en los embriones inoculados, señalan que estos son inconstantes, generalmente poco aparentes y eventualnebe desapa recen en pasajes sucesivos (Hart y cols.1949; Abdussalam,1957b, y Nagington y Whittle,1961). A esto deben agregarse las comunicaciones negativas- (Greig,1956 y Zebrowski y cols.1974). Pese a lo anterior, el virus a sido demostrado en membrana corio-alantoidea infectadas en forma directa , mediante microscopía electrónica (Sawhney y Spasova, 1973) (1,2).

El primer intento de multiplicación viral en cultivos celulares corresponde a Greig (1957), utilizando cultivos primarios de piel fetal ovi- y como inóculo un macerado de costras (1,2). El ECP se hizo notable entre el tercer y cuarto día posinóculo. Se ha observado que el virus de ectima no se comporta como un agente exigente en cuanto a sus necesidades de sustrato celular para su multiplicación efectiva (1). Sin embargo se ha señalado que el virus de ectima tendría una mejor respuesta de multiplicación en cultivos primarios que en líneas celulares (Nagington y cols.1965) (1,2).

2.- MORBILIDAD Y MORTALIDAD:

El ectima cursa por lo general con una morbilidad alta de 70 a 90%, y en algunos casos puede llegar a ser del 100% entre los animales susceptibles (principalmente entre corderos y cabritos menores de un año) (1,2,4).

El ectima contagioso rara vez es fatal, por lo que la mortalidad suele ser muy baja, no excediendo al 1%, pero cuando se ve complicado con infecciones bacterianas y/o parasitarias se eleva a un 20-50% (2,4,7,15). Las complicaciones más frecuentes son ocasionadas por larvas de moscas (miasis) y por bacterias piógenas, como Fusobacterium necrophorum. Se han reportado casos de ectima contagioso asociado a Dermatophilus congolensis (streptotricosis), en Nueva Zelanda, (Cooper y cols.1970); en Kenia, Munz (1969), también la reporta como complicación secundaria de ectima en ovejas (2).

3.- TRANSMISION:

Este aspecto de la enfermedad no ha sido investigado adecuadamnete en términos experimentales, las hipótesis al respecto se fundamentan en obser

vaciones clínicas de los brotes, y no explican completamente la presentación explosiva de la enfermedad en los rebaños susceptibles (1).

En la naturaleza ocurren casos típicos de la enfermedad, en los que se presume que el virus entra al huésped por medio de una abrasión en la piel de los labios y cara. Las abrasiones o heridas pueden ocasionarse por rastrojos duros, arbustos espinosos (Templetonia retusa) o plantas similares (2,4,6), herramientas, agua, camas, lana e instrumental de esquila (1, 4). El virus puede ser transmitido además por la ubre de ovejas afectadas clínicamente a corderos lactantes (2). Jungherr y Hardy (1930), demostraron que la enfermedad se transmite naturalmente por contacto directo de cabrito a cabrito, pero rara vez ocurre de cabrito a cordero (4).

Estas situaciones sin embargo, no resultan totalmente coherentes con la rápida aparición y diseminación de la enfermedad en los rebaños. Por lo que se ha propuesto que estos mecanismos de transmisión iniciarían la enfermedad en una parte del rebaño, mientras que el resto se contaminaría a partir del contacto directo con los primeros animales enfermos (1,2,4). Aun con estas situaciones, se pueden plantear algunas objeciones (1):

a) La contaminación directa a partir de forrajes toscos o malezas espinosas, no resulta un buen recurso para explicar la presentación de la enfermedad en animales jóvenes lactantes.

b) Sería difícil explicar la aparición explosiva de la enfermedad en hatos sin antecedentes de la misma y en los que no se han introducido animales con cuadro clínico. Sin embargo se puede proponer el contagio a partir de portadores asintomáticos o de objetos inanimados, pero esto no explica la aparición simultánea en todos los animales susceptibles.

c) La presentación de la enfermedad en corderos menores de dos semanas, concentrados en maternidades artificiales desde los 2 días de edad, hace difícil la aplicación de estos modelos de transmisión, aunque se han propuesto como objetos infectantes las pezoneras y bardas en mal estado (Wachendorfer y Valder, 1980) (1,16).

En consecuencia se puede pensar en otras vías de infección, como la respiratoria, tal como ocurre en viruela humana (Fenner y cols., 1974) y viruela ovina (Singh y cols. 1979), o por insectos picadores que actúen como vectores mecánicos (Fenner y cols. 1974), aunque debe señalarse que

los intentos de reproducir la enfermedad mediante inoculación subcutánea e intravenosa, resultaron negativos (Glover, 1928, citado por Boughton y Hardy, 1934) (1,4).

4.- PERIODO DE INCUBACION:

El periodo de incubación de la enfermedad ha sido estimado por medio de inoculaciones experimentales, mediante la escarificación cutánea, lo que podría no ser un método muy confiable o traspolable en sus resultados a las formas naturales de la enfermedad. Luego de la escarificación cutánea, el primer indicio o signo de la actividad viral es un ligero eritema alrededor del punto o área de inoculación, que aparece dos o tres días después de la infección (posescarificación) (1,2).

5.- PATOGENIA:

Es muy escasa la información que existe sobre este tema y los pocos reportes se refieren únicamente a observaciones de casos clínicos ocurridos en la naturaleza, con poca o nula participación experimental.

Considerando las vías de transmisión propuestas anteriormente, y sabiendo que el virus de ectima es altamente epiteliotrópico, se podría explicar el desarrollo y localización de las lesiones en los animales, pero aun quedaría como interrogante, el punto sobre la rápida diseminación de la enfermedad en un rebaño.

Los reportes de asociación de ectima con otras enfermedades como paratuberculosis, linfadenitis caseosa (15), micosis (Morales y Van Kruiningen, 1971) y en ocasiones también el parto (Beck y Taylor, 1974 y Howarth, 1929) (1), hacen suponer que estas situaciones provocan una depresión inmunológica en los animales, rompiendo el equilibrio existente entre el virus y los mecanismos de respuesta inmune, diseminándose simultáneamente la enfermedad en un alto porcentaje de animales. Esta hipótesis explicaría satisfactoriamente la rápida presentación de la enfermedad en los animales adultos, pero no así en los corderos menores de dos semanas de vida (1). Leavell y cols. (1968) después de estudiar 19 casos en humanos, proponen tam-

bién la participación de fenómenos de inmunodepresión en la presentación de la enfermedad; Aguilar-Setién (1980), señala que la inducción de inmunodepresión con fines experimentales en becerros, coincidió con la observación de lesiones de estomatitis papular bovina, confirmando el diagnóstico mediante microscopía electrónica; en parte estas observaciones apoyan la hipótesis anteriormente propuesta, (1,3).

6.- LESIONES:

El virus es altamente epiteliotrópico, las lesiones se localizan en piel, en zonas sin lana, principalmente en comisuras labiales y rodete coronario. En algunos casos pueden verse afectadas otras partes del cuerpo, por ejemplo; muslos, axilas, vulva, pezones, prepucio y periné; la forma podal es más frecuente de lo que se reporta, quizás porque este tipo de lesión puede enmascarse por efectos mecánicos y sobre todo por las complicaciones bacterianas (principalmente por F. necrophorus) (1,2,7). Al parecer las presentaciones en genitales, en muslos y en axilas son menos frecuentes. Robinson y Balassu (1981), han encontrado casos de ectima en corderos, donde las se ven predominantemente en lengua. Las lesiones en pezones de ovejas y cabras lactantes pueden determinar la presencia de mastitis severas, (2,7,14).

La mayoría de los casos de ectima no son graves, localizándose las lesiones solo en los lugares ya mencionados y cuando no existen complicaciones la enfermedad es considerada afebril. Sin embargo, Valder y cols. (1979), reportan un brote de ectima en Alemania, con cuadro grave, donde se vieron afectados corderos y animales adultos, observándose alta mortalidad entre los primeros; además de las lesiones podales y genitales en el rebaño, se observaron también estomatitis ulcerativa, faringitis y esofagitis, en el reporte no se mencionan infecciones secundarias (2).

En ovejas y cabras la primera evidencia del desarrollo de la lesión y multiplicación cutánea del virus, es un ligero hinchamiento eritematoso en la región afectada, que es seguida por la aparición de pequeñas pápulas que evolucionan a vesículas y posteriormente a pústulas, las cuales tienden a confluír para formar estructuras de mayor tamaño, que al romperse dejan una superficie de aspecto ulceroso, donde los exudados del teji-

do necrótico, pelos y polvo se adhieren entre sí y se organizan para formar la clásica costra. La mayoría de los autores coinciden en señalar que la evolución desde eritema a costra se desarrolla de 4 a 5 días aproximadamente (1,2,4).

En caso de inoculación experimental, la evolución ocurre entre 7 y 10 días, donde también el primer signo es el hinchamiento eritematoso en la zona de inoculación 2 o 3 días posteriores a la infección. Al 4to y 5to día se ve el desarrollo de pápulas y aparecen pequeñas vesículas que en 24 horas se convierten en pústulas, que posteriormente se rompen dejando una superficie ulcerosa, donde el exudado y polvo van formando al 6to o 7mo día la costra, la regresión y completa resolución de las lesiones se ve a los 28 días. La detallada descripción de estos eventos fue hecha por Aynaud (1923), Glover (1928), Howarth (1929) y Schmidt y Hardy, (1932) (2,4)

7.- HISTOPATOLOGIA DE LAS LESIONES:

Aynaud (1923), describe la observación de degeneración globular en las células del estracto Malpighiano e infiltración de polimorfonucleares en cortes de legua y paladar con lesiones de casos naturales y además lesiones en piel por inoculación experimental (2). Por medio de inoculación experimental en corderos, Glover (1928), describe la apariencia de lesiones en piel al microscopio, y divide el proceso de la enfermedad en tres estados: el primero o estado pápulo-vesicular, se caracteriza por la proliferación del estracto malpighiano. Las vesículas aparecen entre las células superficiales, inmediatamente abajo se ve el estracto lúcido y una marcada infiltración de polimorfonucleares y linfocitos. El segundo o estado vesículo-pustular, se caracteriza porque las vesículas se van agrandando y desarrollando pústulas, que finalmente se rompen hasta llegar al estracto lúcido. La formación de la costra por medio de restos celulares, fibrina y porciones del estracto lúcido, sucede en el tercer estado o de formación de costra (2).

El cuadro descrito por Wheller y Cawley (1956), parece ser de lesiones papilomatosas, las cuales presentan una evolución diferente a las des-

critas anteriormente; para ellos el cambio empieza al 4to día después de la inoculación, donde solo se aprecia congestión de la dermis, al 5to o 6to día se presenta ligera acantosis, con vacuolización de las células superficiales del estracto espinoso; en dermis destaca el infiltrado de mononucleares y proliferación capilar, al 7mo y 8vo día, la degeneración celular en el estracto espinoso, da el aspecto de una red abierta por las células "vacías", y sus paredes, macroscópicamente se observan vesículas. Al día 11, se han desarrollado pequeñas pústulas en la superficie. Entre el día 11 y 17, se observa una marcada hiperplasia pseudoepiteliomatosa y la formación de granuloma, que es el principio de la fase papilomatosa. Entre los días 22 y 40, la lesión involuciona gradualmente, la apariencia papilomatosa va desapareciendo junto con el infiltrado dérmico y ocurre la regeneración total del epitelio (1,2).

En las descripciones anteriores no se menciona la presencia de cuerpos de inclusión, sin embargo Abdussalam (1957), señala que en el citoplasma de las células de epidermis aparecen estructuras de 4 a 8 micras de diámetro, en forma redondeada o irregular y ligeramente acidófilas, que han sido interpretadas como cuerpos de inclusión (1,2.6.15).

En un estudio más reciente Kluge y cols. (1972) inoculan experimentalmente a corderos, describiendo el primer cambio a las 31 horas post-inóculo, como una ligera acantosis. Entre las 55 y 72 horas la acantosis es más evidente, hay presencia de células balonizadas y gran cantidad de inclusiones eosinófilas. Los cuerpos de inclusión han sido interpretados como viriones en composición, DNA y restos celulares (2).

Las observaciones de células infectadas con virus de ectima contagioso al microscopio electrónico revelan severas alteraciones en los organelos, entre las 72 y 143 horas después del inóculo. Se considera que la primera evidencia de replicación viral, es la aparición de gránulos densos, su asociación forma los viriones en los queratocitos, se asume que son partículas virales en maduración. Los viriones en maduración se ven asociados a estructuras de membrana y vacuolas, es posible que su envoltura externa la tomen de la membrana celular. Otros cambios que se observan en los queratocitos son mitocondrias hinchadas, vesículas, estructuras de mielina y cuerpos multivesiculares. Pospischil y Bachmann (1980) suman a las observaciones anteriores la presencia de estructuras filamen-

tosas en el núcleo, las cuales no son descritas por Kluge y cols. (1972) (2).

8.-RESPUESTA INMUNE:

Acerca de los mecanismos de inmunidad existen pocos reportes, de los cuales algunos son muy contradictorios.

Las primeras descripciones de la enfermedad señalaban, que los animales que enfermaban de ectima adquirían resistencia por lo menos por 18-24 meses (4), lo que nos indica la presencia de una respuesta inmune a la enfermedad. La mayoría de los investigadores se han interesado por saber si la respuesta a la infección es mediada por anticuerpos, utilizando procesos estandarizados en serología, como neutralización, precipitación y fijación de complemento. Abdussalam (1958), no encontró asociación del virus de ectima preparado con material costroso, con la prueba de hemaglutinación, (2).

La presencia de anticuerpos en los animales naturalmente afectados o inoculados experimentalmente, fue demostrada originalmente con fines diagnósticos en pruebas de fijación de complemento y aglutinación (Blakemore y cols. 1948) (1). Rottgardt y cols. (1949) brevemente reportan el descubrimiento de niveles detectables de anticuerpos fijadores de complemento, en el suero de ovejas infectadas, (2).

En pruebas de aglutinación, precipitación en gel, fijación de complemento y neutralización, se han descubierto bajos niveles de anticuerpos (Ac) en sueros provenientes de ovejas infectadas 3-4 semanas antes, sin embargo se ha observado que a los 5 meses estos Ac han desaparecido, (Abdussalam, 1958) (2).

La presencia de anticuerpos neutralizantes (AcN) ha sido demostrada mediante pruebas de titulación en microplacas de cultivos celulares, tanto en el suero de animales enfermos y convalecientes (17), como en animales vacunados, en los que se detectaron los títulos entre las 2 y 4 semanas después de la inoculación del virus (11). Sin embargo, Trueblood y cols. (1963a) (5) y Schmidt (1963), fallaron en la demostración de AcN, en el suero de ovejas convalecientes (2), en el estudio hecho por Buddle y cols. (1984) (11), se confirmó que las bajas concentraciones de AcN, del suero de animales expuestos al virus de ectima, pueden ocasionar proble-

mas para ser detectados por la prueba. Esto explicaría satisfactoriamente los conflictos que tuvieron Trueblood y cols., y Schmidt, para demostrar la presencia de estos AcN (11).

Es evidente por estos reportes, que la producción de Ac es variable y su detección depende la sencibilidad de los métodos usados y del grado de respuesta individual de cada animal (2).

En pruebas de desafío por escarificación y demostrando la presencia de Ac por inmunofluorescencia indirecta, Pekelder y cols, (1980), concluyen que los Ac solo tendrían valor diagnóstico y carecerían de valor protector, considerando que los animales desarrollaron lesiones pese a la presencia de Ac. Al parecer los antígenos que inducen la respuesta inmune humoral no tienen un papel significativo para determinar la resistencia a la infección del virus (1,11).

La presencia de AcN ha sido también comunicada en corderos amamantados por hembras consideradas inmunes, en cantidades que los autores señalan como protectoras, por lo menos hasta las tres semanas de vida (17). En otro trabajo también se señala la existencia de inmunidad calostrala, que da protección por 3-4 semanas (18). Sin embargo ninguno de estos trabajos menciona la realización de pruebas de desafío para evaluar el valor de los Ac, tanto en corderos como en animales adultos (1).

En contraste con lo anterior, Boughton y Hardy (1934), observaron cuadros graves de la enfermedad en corderos de 72 horas de nacidos, que fueron escarificados con virus activo, los cuales eran hijos de ovejas vacunadas a los 2 meses de gestación (4) Poulain y cols, (1972), consideran que la persistencia de Ac solo puede esperarse por 2 meses, por lo que posiblemente la vacunación de las madres haya sido demasiado temprana para proporcionar Ac a los corderos (17). Sin embargo, Buddle y Pulford (1984) (12), consideran que la correlación detectada entre los títulos de Ac en calostro de ovejas y en el suero de sus corderos no fue significativa; sus observaciones coinciden con las de Boughton y Hardy (1934) y Richter y Jansen (1968) al comprobar que los corderos no obtienen inmunidad protectora al tomar calostro o leche de sus madres inmunizadas; y solo los animales vacunados entre el 1ro y 4to día de edad, presentaron protección al ser desafiados con virus de ectima un mes después de la vacunación.

La ausencia de inmunidad calostrala también ha sido señalada por otros

autores, basándose en la observación clínica de la enfermedad en crías de madres consideradas inmunes, por haber sido vacunadas o padecido la enfermedad en forma natural (Kerry y Powell, 1971 y Valder y cols.1979) (1).

Al parecer las pruebas serológicas utilizadas para ectima, no son muy confiables para ser generalizadas y usadas para determinar el estado inmune de los animales. Recientemente Robinson y Balassu (1981) (2), señalan que el Dr. L. Fastier en comunicación personal, utiliza la prueba de intradermoreacción para determinar el estado inmune de corderos vacunados, usando como antígeno el virus inactivado por calor. Esta prueba ha sido también usada para establecer individualmente el estado inmune de los corderos vacunados con virus activo de ectima, comparándolo con animales no vacunados, dando aparentemente buenos resultados (12); lamentablemente estas pruebas se realizaron con un número reducido de animales. Estudios previos demostraron que la inoculación del virus inactivado (muerto) por calor, no altera los niveles de inmunidad protectora en los corderos, (12).

Sobre la inmunidad celular que induce el virus de ectima, no existen investigaciones o información concreta, por lo que se supone ocurre algo semejante a los orthopox, en el sentido de que la inmunidad de importancia en la resistencia a la enfermedad es de tipo celular (Blanden y cols.1977, citados por 2,11 y 12. En apoyo a esta hipótesis son especialmente interesantes las descripciones histológicas Leavell y cols.1968 (1); en el ganglio linfático de un cordero inoculado experimentalmente, se observó agrandamiento del ganglio, con proliferación de los cordones medulares y pérdida del límite córtico-medular y más interesante aun es el hecho de que se subraya la ausencia de respuesta folicular. Esta descripción coincide con los conocimientos actuales sobre la distribución de la respuesta de linfocitos B y T en órganos linfoides, con una clara respuesta de tipo T a un estímulo de inmunidad celular.

Lamentablemente y pese al tiempo transcurrido desde las primeras observaciones, la información que existe sobre este tema resulta contradictoria, además de escasa, por lo que poco o nada ha sido el avance en el conocimiento de los mecanismos inmunes que operan en la recuperación y protección contra la infección del virus de ectima (1,2).

9.- DIAGNOSTICO:

Las lesiones proliferativas y las características microscópicas, así como el cuadro epidemiológico, permiten diferenciar al ectima de otras infecciones y dar un diagnóstico clínico relativamente seguro y fácil (2).

Sin embargo cuando ocurren cuadros graves o generalizados puede confundirse con otras enfermedades, resultando complicado el diagnóstico clínico y necesario establecer un diagnóstico diferencial.

A menudo se llega a confundir por las lesiones ulcerativas, en mucosa oral o en la región podal, con las enfermedades vesiculares, particularmente con fiebre aftosa. Considerando la elevada contagiosidad de fiebre aftosa, se podría establecer el diagnóstico en forma epidemiológica, así como el no presentarse la enfermedad en otros animales de pezuña hendida, (Leaniz, 1971) (1),

Otra enfermedad con la que llega a confundirse, es legua azul, la cual presenta una reacción general intensa, con cuadro febril y las lesiones se localizan en el hocico y en las coronas extendiéndose a la mucosa bucal, es más frecuente en los animales adultos que en los lactantes, va acompañada de una mortalidad elevada y una morbilidad baja, lo que la diferencia de ectima contagioso (EC) (1,6,19).

La fotosensibilización las dermatitis pustulares producidas por piógenos (principalmente Staphilococos aureus), también deben ser consideradas en el diagnóstico diferencial; en el primer caso las lesiones difusas en las partes de piel no pigmentadas del dorso del hocico y las orejas son frecuentes, pero estas localizaciones son poco observadas en EC; el segundo caso por lo regular se observa en corderos criados artificialmente o en situaciones de hacinamiento de los animales, con pobre condición higiénica; generalmente las lesiones tienden a mantener su individualidad y es raro que se formen costras confluentes como en EC (1, 16). La dermatitis ulcerativa, es una enfermedad poco estudiada, el cuadro clínico y su agente casual son muy parecidos al de EC, y a veces causa confusión en su diagnóstico (19); se ha observado que los dos virus se comportan en forma idéntica en distintas pruebas "in vitro", sin embargo en pruebas de protección cruzada, se han encontrado diferencias, pero considerando que no es raro observar lesiones de ectima en animales

vacunados, el escaso valor de estas pruebas para ectima y la relación en pruebas de Neutralización y precipitación en agar, hacen suponer que esta enfermedad sea provocada por una variante antigénica del virus de EC (1,20).

Finalmente deben incluirse en el diagnóstico diferencial a los capripoxvirus: viruela ovina y caprina, y papilomatosis. En el caso de las viruelas las lesiones tienden a mantener su individualidad, no confluyen y se presentan en toda la piel. En viruela ovina la reacción sistémica es sumamente grave, con mortalidad elevada y con lesiones en órganos internos. En viruela caprina el cuadro es poco intenso, el aspecto de cráter de las lesiones de viruela en sus formas típicas, es un elemento que puede ayudar en el diagnóstico clínico. La papilomatosis es una enfermedad rara en ovinos y caprinos, su baja incidencia y las características de las lesiones se consideran en el diagnóstico (1).

Teniendo en cuenta el cuadro clínico y epidemiológico de EC, el diagnóstico clínico es relativamente sencillo, y también cuando no se presentan complicaciones bacterianas y/o parasitarias que lo dificulten. En dichos casos el diagnóstico se complica y es necesario utilizar otros métodos (pruebas serológicas o microscopía), para determinar y confirmar el diagnóstico.

Como ya se dijo anteriormente, no existen pruebas serológicas confiables y sensibles, para determinar el estado inmune de los animales afectados con el virus de ectima, lo cual tiene gran repercusión negativa al diagnosticar la enfermedad por medio de ellas, pues se dificulta la detección de Ac en animales convalecientes o en presuntos portadores; ya que los niveles de estos Ac caen rápidamente en 4 o 5 meses posterior a la exposición del virus (17).

Sin embargo algunos autores han tratado de usar diferentes pruebas serológicas para diagnosticar animales expuestos al virus; Sawhney y cols. (1973) reportan la utilización de precipitación en agar-gel para detectar antígeno, pero la técnica no resulta lo suficientemente sensible para detectar Ac en animales convalecientes. En estudios de casos naturales y experimentales de la enfermedad en ovejas, la prueba de fijación de complemento parecería ser el método más sensible para detectar antígeno en

costras viejas (Romero-Mercado y cols 1973) (2); la prueba de seroneutralización a sido una de las más usadas, pero se considera menos sensible que la anterior. Recientemente se ha reportado el uso de la prueba de ELISA, con muy buenos resultados para detectar Ac contra EC, (McKeever, 1984) (1).

Se ha empleado fluorescencia directa sobre cultivos celulares infectados con material sospechoso (Erikson y cols. 1975) e inmunofluorescencia indirecta para detectar la presencia de Ac anti-ectima en el suero de animales vacunados y expuestos, con resultados aparentemente promisorios, (1'7).

La inoculación de animales susceptibles, fue la primer prueba utilizada, para el diagnóstico de EC; en la prueba se usaban corderos susceptibles, que eran inoculados con el macerado de las costras de animales enfermos, para observar en ellos el desarrollo de lesiones. Al mismo tiempo, animales inmunizados eran inoculados con el mismo macerado, éstos no debían presentar lesiones. Esta prueba tiene varios inconvenientes, primero el mantener animales en aislamiento y el estar seguros de que sean susceptibles a la enfermedad o resistentes (1,4), además de que animales inmunizados, al ser inoculados con virus activo llegan a presentar lesiones (11). La inoculación por escarificación en conejos y perros ha sido recomendada como prueba de confirmación diagnóstica, ya que de resultar positiva se pueden descartar las demás etiologías virales específicas del huésped, el inconveniente en el empleo de estas dos especies es su inconsistencia en los resultados (1).

El uso de tinción negativa para microscopía electrónica, es probablemente el método más rápido y seguro como diagnóstico de laboratorio; este método consiste en utilizar el macerado de las costras sospechosas, si es positiva la muestra es fácil detectar las partículas virales por su tamaño y morfología característica; sin embargo, Romero-Mercado y cols, (1973) señalan la posibilidad de obtener resultados falsos negativos, al utilizar costras extraídas al final del proceso de curación, donde el número de partículas es muy escaso, por lo que es importante la elección del tipo de costras, si se va a usar microscopía electrónica para confirmar el diagnóstico (1,2).

Tanto la inoculación a animales susceptibles como la microscopía elec

trónica para confirmar el diagnóstico (1,2).

Tanto la inoculación a animales susceptibles como la microscopía electrónica, presentan un importante inconveniente como pruebas diagnósticas, no pueden ser empleadas para detectar animales portadores.

En dos trabajos y en uno de ellos como comunicación personal (2,12), se señala la utilización de la intradermoreacción como prueba diagnóstica en ectima. Lamentablemente en estos estudios la utilización de la prueba de intradermo, ha sido limitada al diagnóstico de animales vacunados o desafiados con el virus activo, trabajando con un número reducido de animales y en un tiempo breve posterior a la vacunación, sin haberse utilizado en animales que padecieron la enfermedad naturalmente o que se pueden considerar como portadores del virus después de recuperarse.

10.- TRATAMIENTO:

Al ser una enfermedad ocasionada por un virus, el tratamiento resulta insatisfactorio e impráctico, excepto cuando ocurren infecciones secundarias, donde es recomendable la aplicación de antisépticos sobre las heridas (2).

Se ha recomendado el uso tópico de aceites y grasas por sus efectos germicidas (4), el problema de este tratamiento es que debe aplicarse diariamente y su eficacia es discutible además de ser impráctico en rebaños muy grandes (1). Otros medicamentos tópicos que se han usado son: soluciones de sulfato de cobre al 5%, aplicada en la piel después de haberse removido las costras; iodo al 7%; solución de creosota y fenol al 3% en vaselina y solución de merthiolate al 6%. El uso de antibióticos tópicos y sistémicos es válido en el caso de complicaciones bacterianas, en el de las miasis se recomienda usar sustancias larvicidas (2,7). También se ha propuesto el uso diario de unguentos con sustancias viricidas como la clorhexidina en los puntos de lesión (1,14).

Para la aplicación y realización del tratamiento tópico, se debe tener en cuenta las siguientes consideraciones:

a) El ectima es una enfermedad de carácter zoonótico, la aplicación de tratamientos tópicos y la manipulación de las lesiones, incrementan las

posibilidades de contagio para el hombre (Blakemore y cols. 1948; Fastier, 1957; Moore, 1973 y Hoxtell y cols. 1975) (1).

b) Las manos de los operarios se convierten en posibles vehículos para el virus, al manipular animales sanos para localizar y tratar a los enfermos (4), estas pueden también servir de vehículos a los gérmenes involucrados en las infecciones secundarias (1,7).

Por estos riesgos e incomodidades, es preferible y recomendable el controlar la enfermedad en lugar de dar un tratamiento.

11.- CONTROL Y PROFILAXIS:

Al establecer la etiología de la enfermedad, se emplea como profilaxis un procedimiento semejante, si no idéntico a la variolización, esta técnica parece conferir una inmunidad sólida al menos por un año, y si algunos animales enferman la presentación del cuadro es generalmente benigna (1). En corderos la vacunación no les afecta, sino que reduce el curso y la severidad de la enfermedad, y su uso en animales lactantes también es seguro (2,4,7,16).

Pese a lo anterior no son raras las comunicaciones de brotes de ectima en animales previamente vacunados, Peddie (1950), considera estas fallas de vacunación, como el resultado de una incorrecta administración de la vacuna contra ectima, otra posible explicación, es la participación de diferentes serotipos; lo cual ha sido rebatido por Buddle y cols. (1984), al demostrar protección cruzada con dos cepas, que mostraron diferencias en su composición proteica en geles de poliacrilamida (1,11).

La técnica de variolización se practica en la mayor parte de los casos utilizando virus virulento, obtenido a partir de la maceración de costras provenientes de casos de campo. Esta situación impide el uso de este procedimiento en rebaños sin antecedentes de haber padecido la enfermedad (1, 4). La vacunación consiste en escarificar una porción de la piel sin pelo o lana (axilas, región inginal o cara ventral de la base de la cola) y aplicar sobre ella una suspensión del virus virulento. La vacuna puede ser comercial o autovacuna, prepara de un macerado suspendida en solución salina, mezclada con una porción igual de glicerina, con o sin adición de an-

tibióticos (2,4,7). Las especificaciones británicas recomiendan el tratamiento con éter, en una relación 1:10 de volumen, durante 12 -24 horas a 2-4 °C, y luego de remover el éter adicionar glicerina en proporción del 25% (1,2) En los corderos la administración de la vacuna, también es por escarificación.

A la semana deben ser examinados los animales escarificados, para ve rificar el desarrollo de lesiones típicas de ectima en la región del inóculo (1,4). A los 13 días después de la vacunación la inmunidad es comple ta y la duración de esta varía de 6 a 8 meses (2,4).

Con excepción de una vacuna inactivada con calor, la vacunación arri ba mencionada, no es más que una infección artificial controlada, en un lugar donde no le cause molestias al animal. En la práctica la infección así desarrollada equivaldría a la natural posinfección. La inmunidad adquirida por la vacuna INACTIVADA con calor, no es capaz de prevenir la pre sentación de lesiones locales en el punto de escarificación con virus virulento (7).

Se ha visto que la vacuna con virus muerto no tiene valor como agente inmunizante (2), esto es confirmado por Buddle (1984), al comprobar que la aplicación del virus inactivado (muerto) por calor no varía los niveles de inmunidad protectora en corderos (12).

Se han realizado intentos por reducir o eliminar la virulencia, mediante el pasaje del virus en diferentes sistemas (conejo, cultivo celular de diferente origen); en los casos en que se han realizado pruebas de desafío los virus de pasaje celular parecen ser menos inmunogénicos que los de origen ovino (1,11).

Schmidt (1967), ha reportado que el tiempo que dura la inmunidad varía según las zonas afectadas en el animal; en el caso de presentar lesio nes por reinfección en labios y patas, la inmunidad se prolonga un poco más, que en los casos donde las lesiones se localizan en genitales, glán dula mamaria u otros lugares. El tiempo que dura esta inmunidad no ha sido bien establecido, (2).

Dada la presentación estacional de la enfermedad, la tendencia a ocu rrir en forma bianual en los hatos con antecedentes y la aparente duración de la inmunidad por un año después de la vacunación, se recomienda vacunar los hatos en riesgo anualmente, previos a la presentación habitual en la

región, parecería que es suficiente con inocular los corderos y cabritos nacidos en el año, pues se considera que los animales adultos anteriormente vacunados continúan reforzando su inmunidad por el contacto con el virus de campo (1).

Las vacunas de virus activo preparadas con material costroso son las de uso más común, por su bajo costo de producción; las vacunas derivadas de cultivo celular, tienen resultados promisorios (2).

II.- OBJETIVOS:

El ectima contagioso es una enfermedad poco estudiada, en la descripción anterior se tocaron temas de los que existe muy poca información, además de que en algunos casos es contradictoria; el estudio de los mecanismos de inmunidad y las pruebas que sirvan para diagnosticar animales expuestos o libres del virus, forman parte de estos temas.

Actualmente se considera que la respuesta inmune protectora en el ectima contagioso es de tipo celular. Al mismo tiempo se propone la utilización de la intradermoreacción como prueba diagnóstica para ectima y en la detección de posibles portadores o animales expuestos; en consecuencia se proponen los siguientes objetivos:

- I) Evaluar el virus de ectima contagioso inactivado por calor como antígeno, en pruebas de intradermoreacción con fines diagnósticos en animales que han padecido la enfermedad y en aquellos que no la han sufrido, pero han estado expuestos.
- II) Verificar la presencia de respuesta inmune celular, utilizando virus de ectima contagioso inactivado por calor en ovinos y caprinos mediante la inoculación intradérmica.

Considerando lo mencionado por Robinson y cols. (1982) (1), de que las partículas 1 o M son las únicas infectantes, y que las 2 o C representan viriones dañados no infectantes y por lo observado en las tinciones negativas que se realizaron después de inactivar el virus de ectima con calor, se planteó un tercer objetivo en este trabajo:

- III) Evaluar por microscopía electrónica con tinción negativa la relación de partículas 1 y 2 en una muestra expuesta a diferentes temperaturas (50, 55 y 60 °C) por distintos tiempos (0, 15, 30, 45 y 60 minutos).

III.- MATERIAL Y METODOS:

1.- VIRUS:

El virus utilizado procede de un macerado de costras de origen caprino, obtenido en Baja California Sur, previamente liofilizado y envasado en viales en unidades de 2 ml , conservadas entre 4 - 10 °C, desde febrero de 1980 .

2.- INOCULOS:

Como inóculos se utilizaron los viales de virus liofilizado; reconstituidos con 2 ml de medio de mantenimiento para cultivo celular (MEM) adicionado de antibióticos. En primera instancia fueron tratados por diferentes procedimientos para inactivar el virus, para de éstos, por medio de una prueba piloto, elegir el método de inactivación más adecuado para utilizarlo como antígeno en pruebas de intradermoreacción.

Los métodos de inactivación empleados fueron: calentamiento en estufa a 70°C por dos horas; inactivación con una solución de formalina con una concentración final de 0.01%; exposición a luz ultravioleta durante 72 horas a una distancia de 7.5 cm, con una lámpara de 1.5 volts. Al mismo tiempo se inocularon soluciones controles; MEM solo , otra con 0.01% de formalina y otros se conservaron con el virus activo. También se ensayo un macerado de costras de pseudoviruela bovina con agua destilada, la cual se dividió en dos soluciones una de virus activo y la otra inactivado por calor (70°C durante 2 horas).

A todos los viales se les realizó tinción negativa, antes y después de ser sometidos a los diferentes métodos de inactivación, para ser observada al microscopio electrónico y verificar de esta forma la presencia de virus.

3.- ANIMALES:

Los animales utilizados para este trabajo fueron ovinos y caprinos de diferentes edades y de ranchos con antecedentes conocidos de la enfermedad.

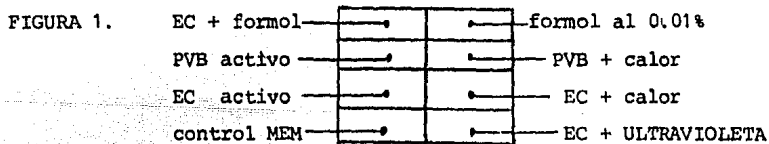
Rancho Almaraz ,FES-C (UNAM); cuenta con un módulo caprino, donde se ha presentado la enfermedad en forma natural, el último brote en abril de 1985, además se han realizado pruebas de vacunación y desafío. El módulo de ovinos no ha presentado formas clínicas de la enfermedad en los últimos 5 años, cabe señalar sin embargo que se encuentran en las mismas instalaciones que el rebaño caprino, separados por un pasillo de 4 metros de aproximadamente.

Rancho Santa Elena; ubicado en el municipio de Teoloyucan Edo. de Méxi-
co; rancho ovino de aproximadamente 400 vientres, más crías, machos y rempla-
zos, con un total de 600 aniamles, en los que se presentó un brote severo de
ectima en los primeros meses de 1983, en los años siguientes se han presenta-
do brotes sucesivos que afectan fundamentalmente a corderos en formas fascia-
les de la enfermedad, mientras que algunas hembras han presentado lesiones
en los pezones .

4.- EXPERIMENTOS:

a) Prueba piloto. - Para conocer el mejor método de inactivación del vi-
rus que funcionara como antígeno al ser inoculado intradérmicamente (ID), se
llevó acabo un pequeño ensayo piloto en ovinos y caprinos de la FES-C. Para
dicho ensayo se utilizaron; 3 corderos de aproximadamente 6 meses de edad y
8 cabritos entre 3 y 6 meses.

Todos los los animales recibieron el mismo tratamiento. En la cara in-
terna del muslo izquierdo, desprovista de pelo y lana, se trazó con un marca-
dor una cuadrícula de 8 espacios ordenados en parejas en una figura rectangu-
lar, en cada cuadro se aplicó un tratamiento ID con la distribución que se
ilustra en la figura 1:



Donde EC = ectima contagioso . y PVB = pseudoviruela bovina.

Los puntos de inoculación fueron examinados diariamente, durante los sie-
te días siguientes a la misma, se midió el diámetro de la zona de eritema y
el espesor de la piel a las 48 horas posinóculo (PI).

b) Prueba a nivel de hato : Después de elegir el virus inactivado por ca-
lor como antígeno, por los resultados obtenidos en el ensayo piloto, se proce-
dió a trabajar con un número mayor de animales ,107 hembras de 6 meses a más
de 4 años de edad del rancho Santa Elena, a estos animales se les aplicó MEM
como control y el virus inactivado por calor, a 20 animales se les realizó
además una prueba para evaluar el antígeno por diluciones logarítmicas, apli

candopuntos 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , por vía ID. Se aplicó también la prueba de intradermoreacción a corderos de 3 - 5 meses de edad, que un mes antes habían sido escarificados con resultados positivos al virus de ectima y animales no escarificados, trabajando un total de 64 corderos, realizando la lectura a las 48 horas, PI.

En el rancho Almaraz, se inocularon 50 caprinos de diferentes edades y sexo en los que se consideraron: animales lactantes que nunca han padecido la enfermedad, ni estuvieron en los brotes naturales reportados en el rebaño; animales prepuberescos y adultos que estuvieron y/o sufrieron la enfermedad en el último brote natural y por último animales procedentes de Celaya, recién ingresados al hato. Del módulo de ovinos se trabajó con 30 animales, que comprendían ovinos de diferentes edades y sexo, incluyendo los que fueron inoculados en el ensayo piloto. Todos los animales fueron inoculados ID con virus inactivado por calor y MEM como control en la parte interna del muslo izquierdo, realizando la lectura a las 48 y 72 horas PI.

5.- HISTOLOGIA DE LA INTRADERMOREACCION (IDR):

Para evaluar las características histológicas de la reacción inflamatoria que ocasiona la inoculación ID del virus inactivado por calor, se tomaron biopsias de cabras y ovinos inoculados con resultados positivos, muestreándose un total de 16 animales. Se colectaron 10 muestras a las 48 horas y 6 a las 72 horas PI, fijándolas en formalina al 10%; las biopsias se procesaron de acuerdo a la rutina para cortes de parafina y se colorearon con hematoxilina-eosina.

6.- EVALUACION DE LAS MUESTRAS TRATADAS POR CALOR EN MICROSCOPIA ELECTRONICA:

Para verificar los efectos del calor sobre el virus de ectima y especialmente sobre la relación partícula 1 y 2, en muestras calentadas a diferentes temperaturas, se procedió a reconstituir uno de los viales con 0.5 ml de agua destilada, a 20°C, se tomó una gota y se realizó la tinción negativa del material reconstituido, considerando esta muestra como virus control (tiempo 0). El resto se dividió en tres tubos de Durhans, para ser calentados a diferentes temperaturas (50, 55 y 60 °C), en cada caso se tomó una gota a los 15, 30, 45 y 60 minutos y se realizó tinción negativa para ser observada al microscopio

electrónico y contar en todos los casos el número de partículas 1 y 2 presentes en cada muestra. El conteo de aproximadamente 100 partículas por muestra, fue realizado por dos personas en forma separada.

En la técnica de tinción negativa se utilizaron rejillas cubiertas previamente con parlodiól. La rejilla se colocó sobre una gota de la muestra, se esperaron 5 minutos, se secó durante 20 minutos y para teñirla se colocó sobre una gota de ácido fosfotungstato (pH 7.4-7.6) por 5 minutos más y se secó durante otros 20, para poder ser observada al microscopio electrónico de transmisión, Jeol 100S a 60 Kw.

El análisis estadístico para los cambios en la relación partícula 1: partícula 2, observados en los diferentes tiempos del tratamiento térmico, fueron analizados mediante regresión lineal y ajustados a un modelo lineal con transformación logarítmica mediante la fórmula: $Y = a + b \ln(x)$, (Snedecor y Cockan, 1981) (21) donde Y = valor de la relación partícula 1 / partícula 2 y $\ln(x)$ = logaritmo neperiano del tiempo (minutos). Con las ecuaciones logradas para las diferentes temperaturas, se ajustaron las curvas para los cambios de la relación partícula 1 / partícula 2 respecto al tiempo.

IV.- RESULTADOS:

1.- PRUEBA PILOTO:

Los resultados obtenidos se resumen en el cuadro 1, señalando el espesor de la piel y el diámetro del eritema en el punto de inoculación. Para considerar los puntos positivos se aplicó un criterio semejante al establecido por Buddle y Pulford (1984) (12), en el sentido de declarar positivos los puntos en el que el espesor de la piel era el doble del de los puntos de control, agregando en la evaluación en diámetro de la zona de eritema.

En la lectura realizada a las 48 horas, los puntos donde se inoculó MEM y el virus de EC inactivado con luz ultravioleta, no mostraron reacción, no había zona de eritema, ni ninguna anomalía palpable, por lo que se omitieron los resultados de EC-ultravioleta en el cuadro, tomando solo como control los puntos inoculados con MEM.

A la inoculación del virus inactivado con formalina, solo un cabrito respondió con una reacción severa que perduró hasta el 7mo día PI, dos cabritos resultaron dudosos; en el control de formalina, 3 cabritos y 1 cordero respondieron a la inoculación, en el caso del cabrito 74 la reacción duró los 7 días PI.

En el caso del virus inactivado por calor, 4 cabritos resultaron positivos, mientras que con el virus de PVB calentado solo 2, incluidos en los 4 anteriores dieron una respuesta leve positiva. Ninguno de los corderos reaccionó con el virus inactivado por calor.

En los 3 corderos y en 2 cabritos, se observó reacción positiva a la inoculación con el virus activo de EC, y solo 3 animales reaccionaron al virus activo de PVB. Por lo menos en tres de estos casos la reacción perduró hasta el 7mo día PI.

2.- PRUEBA A NIVEL DE HATO:

La información obtenida en la prueba de IDR aplicada a los animales de los ranchos Almaraz y Santa Elena se resumen en los cuadros 2, 3, 4 y 5.

En el cuadro 2 se resumen los resultados de la IDR en cabritos previamente escarificados y que sufrieron lesiones en el brote natural que

CUADRO 1 . RESULTADOS DEL ENSAYO PILOTO DE IDR EN CABRITOS Y CORDEROS DEL RANCHO ALMARAZ.

Cabra No.	M.E.M.	EC + FORMOL		FORMOL		EC + CALOR		PVB + CALOR		PVB ACTIVO		EC ACTIVO	
	48 hs. Esp mm	48 hs Esp	7 d diám mm	48hs Esp	7d diám mm	48hs Esp	7d diám mm	48hs Esp	7d diám mm	48hs Esp	7d diám mm	48hs Esp	7d diám mm
64	1.8	1.8	9.0 -	3.5 - -	3.8 9.0 -	1.8 5.0 -	3.5 10 -	1.8 - -	3.5 10 -	1.8 - -			
69	1.5	2.0	8.0 -	1.5 - -	4.0 12.0 -	1.8 6.0 -	2.5 6 +	1.8 - -	2.5 6 +	3.0 10 +			
74	2.0	2.0	- -	2.0 10 +	2.0 6.0 -	2.0 - -	2.5 8 +	2.0 - -	2.5 8 +	2.0 3 -			
84	1.5	4.0	- +	1.5 13 -	3.5 8.0 -	1.5 8.0 +	2.0 - -	1.5 - -	2.0 - -	2.5 8 +			
86	1.0	1.0	- -	1.5 4 -	2.5 10.0 -	1.5 8.0 -	1.5 4 +	1.5 - -	1.5 4 +	1.5 5 +			
85	1.0	2.0	- -	1.0 5 -	1.0 - -	1.0 - -	1.0 - -	1.0 - -	1.0 - -	1.0 - -			
87	1.3	1.3	- -	2.0 10 -	1.3 - -	1.3 - -	1.3 - -	1.3 - -	1.3 - -	1.3 - -			
88	1.8	1.8	- -	2.5 - -	1.8 - -	1.8 - -	1.8 - -	1.8 - -	1.8 - -	1.8 - -			
Corderos No													
504	1.0	1.0	- -	1.5 - -	1.0 - -	1.0 - -	2.0 8 -	1.0 - -	2.0 8 -	2.0 4 -			
506	1.5	1.5	- -	1.0 10 -	1.5 - -	1.5 4.0 -	2.0 8 -	1.5 - -	2.0 8 -	3.0 10 -			
513	1.0	1.0	- -	1.0 - -	1.0 - -	1.0 - -	1.0 - -	1.0 - -	1.0 - -	2.7 4 -			

Donde: M.E.M. = Medio Esteril de Mantenimiento.

EC = virus de ectima contagioso.

PVB = virus de pseudoviruela bovina.

hs. = Horas

Esp. = Espesor de la reacción.

diám = diámetro de la reacción.

mm = milímetros.

afectó al rebaño, observando que 2 animales que habían sido positivos a la escarificación en marzo de 85 y habían desarrollado lesiones leves de EC en el brote de abril del 85, resultaron negativos a la IDR aplicada en febrero del 86, incluyendo 1 que resulto positivo a la IDR en la prueba piloto de septiembre del 85, en las mismas condiciones 2 resultaron dudosos y 4 fueron positivos.

En este cuadro también se observa la respuesta que dieron los animales utilizados en la prueba piloto, que eran cabritos previamente escarificados, resultando 4 animales positivos a la IDR, de los cuales 2 habían sido positivos a la escarificación en mayo del 85, y otros 2 presentaron lesiones leves al brote, uno fue dudoso y tres resultaron negativos, el cabrito número 88 nació después del brote y no fue escarificado.

Tanto en el rebaño de ovinos como en el caprino del rancho Almaraz (cuadro 3), las lecturas de la reacción se realizaron a las 48 y 72 horas PI, observándose una considerable reducción de las reacciones positivas a las 72 horas PI.

En los 2 rebaños se destaca el hecho de que ninguno de los cabritos de menos de 4 meses (12 animales), ni de los corderos de menos de 3 meses (5 animales), resulto positivo a la prueba. Del rebaño caprino, en los animales de 9 meses a 5 años de edad y que habían estado presentes en el último brote de ectima, solo 18 animales dieron positivos a la IDR de 28 inoculados; de las cabras procedentes de Celaya (recien ingresadas al hato) solo 3 resultaron positivas de 10 inoculadas. En el caso de los ovinos, de los animales de 1 a 2 años, 4 resultaron positivos y 5 negativos, sin embargo es necesario señalar que 3 de los animales positivos habían sido utilizados en la prueba piloto, se observa también en los resultados que las lecturas positivas se incrementaron en los animales de más de 2 años, resultando la mayoría positivos a la inoculación; estos resultados son particularmente interesantes considerando que entre los ovinos no se habían detectado casos clínicos de EC en los últimos años, ni habían sido trabajados experimentalmente.

En el rancho Santa Elena (cuadro 4), que ha presentado casos de EC en forma sucesiva en los últimos años, las hembras de 6 meses a 1 año,

CUADRO 2.

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE IDR EN EC EN
CABRITOS PREVIAMENTE ESCARIFICADOS

CABRITO No.	ESCARIF 8/3/85	BROTE NATURAL DE EC 8/5/85	ESCARIF 8/5/85	IDR 8/9/85	IDR 15/2/86
62	+	+			-
63	+++	+			-+
64	+++	-+		+	-
66	+	-+			+
67	-+	++			+
68	-	+++			+
69 _B	+	-+			+
70	+	+			-+
84			+++	+	
85			+	-	
86			+	+	
87			+++	-	
88				-	
69 _R		+		+	
74		++		-+	

Donde: -+ muy leve
+ leve
++ severo
+++ muy severo

CUADRO 3.

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE IDR EN EL
RANCHO ALMARAZ

EDAD DE ANIMALES	No. DE ANIMALES	LECTURAS EN No. DE ANIMALES			
		48 horas		72 horas	
		+	-	+	-
CABRAS					
15 días a 4 meses	12	0	12	0	12
9 a 12 meses	16	11	5	7	9
2 a 5 años	12	7	5	4	8
3 a 5 años - Celaya	10	3	7	1	9
TOTAL:	50	21	29	12	38
OVINOS					
1 a 3 meses	5	0	5	0	5
1 a 2 años	9	4	5	3	6
3 a 5 años	16	15	1	12	4
TOTAL:	30	19	11	15	15

CUADRO 4.

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE IDR EN EL
RANCHO SANTA ELENA

EDAD DE ANIMALES	No. DE ANIMALES	LECTURA EN No. DE ANIMALES			
		48 horas		72 horas	
		+	-	+	-
OVINOS					
6 meses a 1 año	40	34	6		
2 a 3 años	34			24	10
4 y mayores de 4 años	33			17	16
TOTAL:	107	34	6	41	26

CUADRO 5.

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE IDR EN
CORDEROS DEL RANCHO SANTA ELENA

ANIMALES DE	No. DE ANIMALES	LECTURA EN No. DE ANIMALES	
		48 horas	
3 a 5 meses de EDAD		+	-
Corderos escarificados un mes antes	39	24	15
Corderos NO escarificados	25	8	17

presentaron lecturas positivas en una proporción considerable (34 : 40), en las de más de 2 años las lecturas se realizaron a las 72 horas, a pesar de esto las lecturas positivas fueron considerables (41 : 67),. En las hembras en que se ensayo el uso de las diluciones del antígeno, solo 9 resultaron positivas a la dilución 10^{-1} ; 5 de estos 9 hasta la 10^{-2} , y solo 1 respondió a la dilución 10^{-3} , el resto (11 animales) fueron negativos a las diluciones.

En el caso de los corderos que se probaron en este rancho (cuadro 5), 39 previamente escarificados con virus vivo de EC, 24 fueron positivos y solo 15 negativos, en 25 NO escarificados, 8 resultaron positivos y 17 negativos a la IDR, las diferencias entre estos dos grupos son estadísticamente significativas en prueba de χ^2 (5.32), las lecturas se realizaron a las 48 horas PI.

3.- HISTOLOGIA DE LA PRUEBA DE IDR:

En las biopsias de las IDR positivas a las 48 horas; se observó en la dermis un infiltrado abundante de células mononucleares, que se consideraron linfocitos por sus características morfológicas; núcleos redondos, picnóticos con escaso o nulo citoplasma; se encontro además edema congestión ligera, se pudo observar acumulos focales de neutrófilos y eosinófilos dispersos, en algunos casos incluidos en las luces de las glándulas sudoríparas. Una de las muestras presentó un infiltrado abundante de polimorfonucleares en la subdermis, con una marcada congestión.

En las biopsias obtenidas a las 72 horas, la reacción vascular (edema y congestión) se vio disminuida, se observó con mayor frecuencia un infiltrado predominantemente linfocitario en la dermis, encontraron polimorfonucleares en la subdermis, siendo muy escasos. En este caso son notables los eosinófilos en cantidad y tamaño con respecto a los neutrófilos.

4.- EVALUACION DE LAS MUESTRAS TRATADAS POR CALOR:

En las tinciones negativas que se realizaron a las muestras no tratadas, se pudo constatar que el número de partículas impermeables al fosfotungstato, que son consideradas las únicas de tipo infectante (Robinson y cols. 1982) (1), era muy alto, además de no observarse contaminantes bacte

rianos, virales y / o fúngicos; en las muestras tratados por calor, luz UV y formalina, este tipo de partículas no fue observado y por el contrario se constató la presencia de estructuras algo parecidas en tamaño y forma al virus de EC, pero permeables al fosfotungstato y sin estructura interna o externa definida, este tipo de estructuras fue observado en muy bajo número, considerando la riqueza de partículas infectantes de las muestras originales.

En el cuadro 6 se resume el conteo de las dos personas, de partículas 1, impermeables y de partícula 2 permeables. En la muestra a 20°C, tomada al tiempo 0, se observó que la cantidad de partículas 1 es muy elevado, mientras que las partículas 2 fueron más escasas (86- 34) (fig. 1).

En las muestras calentadas a 50°C durante 15, 30 y 45 minutos se observó que la cantidad de partículas 1 se mantenía, mientras que las 2 aumentaba paulatinamente, a los 60 minutos de exposición la cantidad de partículas 1 y 2 casi se igualó, siendo aún más abundante las de tipo 1 (55-44).

En el caso de las muestras calentadas a 55°C se observó que la cantidad de partícula 1 se mantenía elevada, pero también aumento el número de partícula 2 entre los 15 y 30 minutos de exposición. A los 45 y 60 minutos de exposición (fig. 2), el aumento de partícula 2 fue más evidente, disminuyendo considerablemente las partículas 1 (21-56 y 21-93 respectivamente).

En las muestras calentadas a 60°C, se encontró muy disminuido el número de partículas en general (1 y 2), encontrándose un gran número de estructuras permeables al fosfotungstato, sin estructura interna o externa definida, y en ocasiones algo más grande que el virus infectante, este tipo de estructuras aumento a los 45 y 60 minutos de exposición. En las partículas contadas se observa que desde los 15 minutos de exposición, el número de partículas 1 fue mucho menor que el de partículas 2, que al final de los 60 minutos llegaron a ser 83 en total.

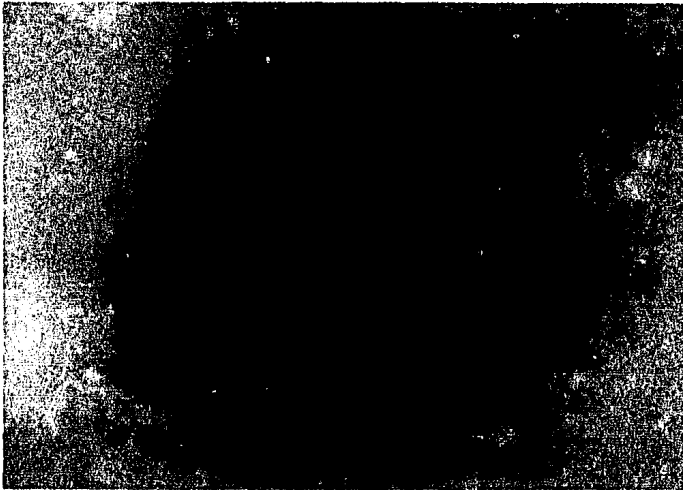
TEMPERATURA	ECUACIONES	COEFICIENTES DE DETERMINACION
50°C	$Y = 2.72 - 0.228 \ln(x)$	$r^2 = -0.61$
55°C	$Y = 2.77 - 0.526 \ln(x)$	$r^2 = -0.88$
60°C	$Y = 2.40 - 0.603 \ln(x)$	$r^2 = -0.97$

Los coeficientes de determinación, a excepción del ajuste para 50°C, en el modelo utilizado fueron altos. Mediante los coeficientes de regresión de las ecuaciones ajustadas, se explica en forma adecuada las diferencias en el cambio de la relación partícula 1 / partícula 2, estos coeficientes nos indican que al aumentar la temperatura la reducción en la relación de partículas 1/2 es mayor por unidad de tiempo, lo que se observa al graficar los valores obtenidos en las ecuaciones, que a excepción de los de 50°C, los demás forman una curva donde es evidente dicha disminución (gráfica 1). Por otra parte es importante comentar que para las tres curvas obtenidas de las ecuaciones, el punto de corte en el eje de las Y fue similar y con valores cercanos al control.

Fig. 1 .- Partículas de tipo 1; impermeables al fosfotungstato, se observa claramente el filamento de superficie, 35 000 X, 0 minutos 20°C.



Fig. 2 .- Partículas de tipo 2; permeables al fosfotungstato, se aprecia la estructura interna del virus y sus cubiertas, 35 000 X, 60 minutos 55°C.



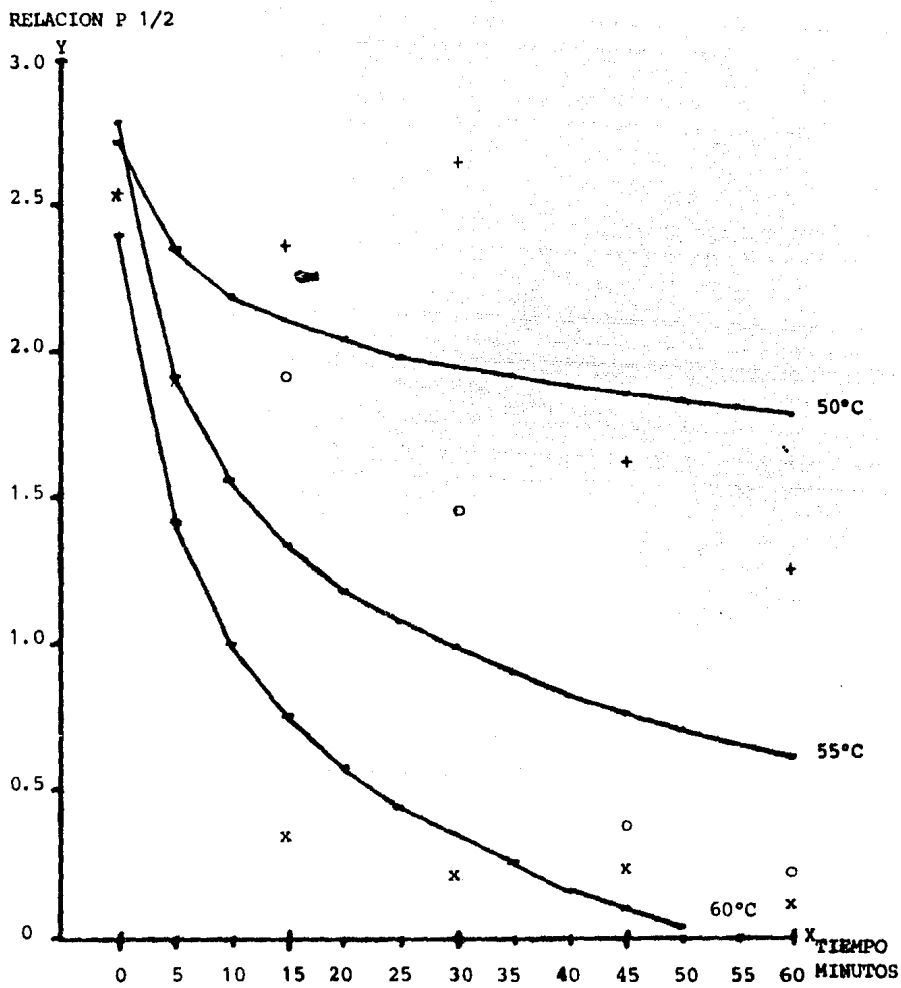
CUADRO 6.

RESULTADOS DEL CONTEO DE LAS
MUESTRAS TRATADAS CON CALOR

TIEMPO Minutos	OBSERVADOR 1		OBSERVADOR 2		TOTAL		RELACION P 1/2	TRATAMIENTO Temperatura
	P1	P2	P1	P2	P1	P2		
0	48	15	38	19	86	34	2.53	20°C
15	40	10	36	22	76	32	2.37	50°C
30	36	12	54	22	90	34	2.64	"
45	34	16	42	31	76	47	1.62	"
60	27	20	28	24	55	44	1.25	"
15	49	19	35	24	84	43	1.93	55°C
30	27	31	39	15	66	43	1.45	"
45	20	16	1	40	21	56	0.38	"
60	11	44	10	49	21	93	0.22	"
15	4	18	11	22	15	40	0.37	60°C
30	5	35	8	27	13	62	0.21	"
45	5	18	9	44	14	62	0.22	"
60	5	38	8	45	13	83	0.16	"

Donde : P1 = partícula de tipo 1.

P2 = partícula de tipo 2.



GRAFICA 1 .- RELACION PARTICULA 1/2 CON VALORES AJUSTADOS A ECUACIONES DE MODELO LINEAL.

- * VALORES REALES DE LA RELACION PARTICULA 1/2.
- 20°C
 - + 50°C
 - o 55°C
 - x 60°C

V .- DISCUSION:

1.- EXPERIMENTO PILOTO:

A pesar de que el número de animales utilizados en el experimento piloto fue muy reducido (11), se pudo apreciar en los resultados que la inactivación del virus por calor, fue el que mejor actividad antigénica mostró en la prueba de IDR (4 de 7 animales inoculados), es necesario recordar -- que de los 11 animales inoculados en 4 (3 ovinos y 1 cabrito) no se esperaba respuesta, ya que no habían tenido contacto con la enfermedad, de esta forma se confirmó la efectividad del virus inactivado por calor, al ser -- utilizado como antígeno en pruebas de IDR, lo cual ya había sido observado por Buddle y Pulford (1984). En los otros métodos ensayados para inactivar el virus de EC (formalina y luz ultravioleta), se observó que solo un animal respondió a la inoculación del virus-formalina y ninguno a la de virus ultravioleta; en el primer caso , la reacción perduró hasta el 7mo día PI y los tres animales que resultaron positivos a la inoculación del control de formalina, hacen suponer que la respuesta se debió principalmente a una reacción irritativa y no a una de hipersensibilidad retardada, a pesar de lo anterior, este método de inactivación del virus para usarlo como antígeno, no debe ser descartado por completo sin antes realizar otras pruebas, ya que posiblemente la concentración utilizada de formalina fue muy alta provocando irritación en el punto de inoculación, quizás sometiendo la muestra a una menor concentración de formalina o a un proceso de diálisis se reduciría este problema.

La falta de respuesta a la inoculación del virus-ultravioleta, comprueba lo señalado por Sawhney (1972) (10), en la eficacia de las radiaciones de luz ultravioleta para inactivar (matar) el virus de ectima.

La reacción a la inoculación de virus activo de ectima, parece ser provocada principalmente por la actividad viral en el tejido sobre el punto de inoculación, lo que ocasionó una respuesta inflamatoria más prolongada (hasta el 7mo día PI), ocurriendo de igual forma para los puntos inoculados con PVB activo, (3 positivos de 11 inoculados), lo que sugiere -- que el virus de PVB es capaz de multiplicarse en los tejidos ovinos y caprinos; esta observación, podría reforzar los planteamientos en torno al

parentezco de estos virus y la posible evolución de este género viral (Wittek y cols., 1979 y Wittek y cols.1980) (1).

Dos de los cuatro animales que respondieron a la inoculación de virus de EC-calor, también respondieron a la de PVB-calor, lo que podría apoyar el parentezco entre estos dos virus en pruebas serológicas (immunodifusión Huck,1966 y Papadopoulos y cols.,1968; y seroneutralización, Huck,1966) (1). La relación antigénica entre los parapox es de tal magnitud que se considera inadecuado reconocer a las especies de este género viral mediante pruebas de neutralización o de fluorescencia, las pruebas de análisis de genoma con enzimas de restricción e hibridación, confirman las estrechas relaciones entre estos virus que comparten una buena parte del genoma (Gassmann y cols. 1985) (1).

Pese a lo anterior, la relación entre estos dos virus, debe ser considerada con reserva, por lo menos en lo que se refiere a pruebas de IDR, ya que el número de animales utilizados fue muy reducido, como también las respuestas positivas.

2.- PRUEBA A NIVEL DE HATO:

En la prueba a nivel de hato el 67.6 % de los animales adultos fueron positivos a la inoculación ID de EC-calor. Siendo particularmente interesantes los resultados obtenidos en el módulo ovino del rancho Almaraz, donde no se esperaba un número de positivos tan alto; 19 animales de 25 inoculados, ya que estos animales no han tenido antecedentes de haber sufrido la enfermedad, pero si de haber estado expuestos al virus. Esto demuestra que la inoculación intradérmica de virus-calor, puede diagnosticar animales expuestos al virus sin que hayan padecido la enfermedad en forma clínica. Los resultados negativos que se obtuvieron en este rancho en el módulo de ovinos y principalmente en el de cabras, y en los ovinos del rancho Santa Elena, ponen en duda el uso de esta prueba para detectar en forma individual animales que hayan padecido la enfermedad o que han estado expuestos al virus, en el primer caso tanto en las cabras como en los ovinos del Santa Elena, se han presentado en forma natural brotes de ectima, afectando casi al total de los animales.

En la discusión anterior no se incluyeron los animales menores de 5

meses, ya que en caso de los cabritos y los corderos del rancho Almaraz , todos fueron negativos a la IDR, lo cual era de esperarse al tener en cuenta que por su corta edad estos animales no habían estado expuestos al virus, ni a los brotes de ectima en el caso de los cabritos ni en trabajos experimentales . En los corderos del rancho Santa Elena, se pudo apreciar - que los animales escarificados un mes antes, presentaron un número mayor de positivos que los no escarificados, dando una diferencia estadísticamente significativa en prueba de χ^2 ($\chi^2 = 5.32$); sin embargo, la prueba de IDR presentó ciertas irregularidades, al dar negativos y positivos en los dos grupos; esto concuerda también con lo observado en los cabritos del Almaraz, en los que de 14 animales escarificados, 4 resultaron negativos a la prueba. Lo anterior pone en duda lo propuesto por Buddle y Pulford (1984) y Robinson y Balassu (1981) , en usar la prueba de IDR para evaluar el estado inmune individual de los animales antes y después de la vacunación , a pesar de esto no se invalida el uso de la prueba para este fin, ya que las irregularidades pueden ser cubiertas al muestrear un número mayor de animales.

Debido a estas observaciones se puede considerar que la prueba de IDR utilizando como antígeno virus inactivado por calor, es útil y suficientemente sensible a nivel de hato, para diagnosticar hatos que han sufrido la enfermedad o que han estado expuestos al virus incluso en situaciones de "vacunación".

Las características de los elementos encontrados en el estudio histopatológicos del exudado de las diferentes biopsias, concuerda con lo que se considera una reacción típica de hipersensibilidad retardada tipo IV, la cual corresponde a una respuesta de inmunidad mediada por células, apoyado también por el tiempo de duración de la reacción (48 a 72 horas) post inoculación.

Respecto al uso del antígeno (EC-calor) diluido, aparentemente no dió muy buenos resultados, ya que de 20 animales inoculados, solo 9 respondieron a la dilución 10^{-1} y solo 1 hasta la 10^{-3} , a pesar de esto se puede considerar que el liofilizado utilizado tiene la suficiente cantidad de virus infectante, que al ser inactivado y diluido en base 10, contiene la cantidad de antígeno necesaria para provocar una respuesta al ser inoculado ID.

Las tinciones negativas de muestras calentadas revelaron al conteo la disminución de partículas 1 infectantes, y el aumento paulatino de partículas 2 no infectantes, al ser expuestas las muestras a 50, 55 y 60°C por diferentes tiempos. El modelo utilizado, para el ajuste de las ecuaciones, permite explicar en forma adecuada las diferencias en el cambio de la relación partícula 1 / partícula 2. Los coeficientes de regresión nos indican que al aumentar la temperatura la reducción de la relación - partícula 1 / partícula 2 es mayor por unidad de tiempo. Los coeficientes de determinación, a excepción del ajuste para 50°C, fueron altos, es importante y necesario comentar que el punto de corte con el eje de las Y fue similar para las tres ecuaciones y con valores cercanos al control.

La caída en la relación partícula 1 / partícula 2, se hace evidente a los 60°C desde antes de los 15 minutos de exposición, lo que nos indicaría que a una mayor temperatura (70°C, temperatura usada para inactivar el virus en este trabajo) la caída de partículas 1 sería total desde el inicio del tratamiento. Considerando lo propuesto por Robinson y cols. , 1982, de que las partículas 1 son las únicas de tipo infectante y por los resultados obtenidos en este trabajo se confirma lo observado por Aynaud (1924), Sawhney (1972) y Buddle y cols (1984) en la pérdida de infectividad del virus tanto para cultivo celular como para animales susceptibles, al ser sometido a un tratamiento de temperatura mayor de 55°C por más de una hora de exposición.

Si se consideran válidas las observaciones de Robinson y cols. (1982) respecto a la pérdida de infectividad de la partícula 2; y las de Buddle y Pulford (1984) en que un tratamiento a 65°C por una hora inactiva el virus de ectima; las curvas confeccionadas en este trabajo, permiten con una muy razonable aproximación predecir la capacidad infectante de una muestra inactivada total o parcialmente por calor.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Tórtora P.,J. (1985), Ectima Contagioso en Ovinos y Caprinos, Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en el área de Microbiología. Asesor Dr. Eliseo Hernández B. (FES-C, UNAM).
- 2.- Robinson,A.J. y Balassu, T. (1981), Contagious pustular dermatitis (orf), Vet. Bull. 51: 771 - 782.
- 3.- Sanchez. R.L.; Hebert,A.; Lucia,H. y Swedo,J. (1985), A case report with histologic, electron microscopic, and immunoperoxidase studies, (orf). Arch. Pathol. Lab. Med. 109: 166-170.
- 4.- Boughton,I.B. y Hardy,W. (1934), Contagious ecthyma (sore mouth) of sheep and goats. J. Am. Vet. Med. Ass. 85: 150-178.
- 5.- Trueblood,M.S.; Chow,T. y Griner,L. (1963), An immunologic study of ulcerative dermatosis and contagious ecthyma. Am.J.vet. Res. 24: 42-46.
- 6.- Gardiner,M.R.; Craig,J. y Nairn,M. (1967), An unusual outbreak of contagious ecthyma (scabby mouth) in sheep. Aust. vet.J. 43: 163-165.
- 7.- Pekelder,J.J., Talmon,F. y Boer,M. (1980), Ecthyma, a known disease, of which little is known. Tijdschr. Diergeneesk. 105: 232-239.
- 8.- Mitchiner,M.B. (1969), The envelope of vaccinia and orf viruses; an electron-cytochemical investigation. J.gen. Virol. 5: 211-220.
- 9.- Wittek,R.; Kuenzle,C. y Wyler,R. (1979), High C+G content in parapoxvirus DNA. J.gen. Virol. 43: 231- 234.
- 10.-Sawhney,A.N. (1966), Studie on the virus of contagious pustular dermatitis-phisico-chemical properties. Indian vet. J. 49: 14-19.
- 11.- Buddle, B.M.; Dellers, R. y Schuring,G. (1984), Contagious ecthyma virus-vaccination failures. Am. J.vet. Res. 45: 263-266.
- 12.-Buddle,B.M. y Pulford, H.D. (1984), Effect of passively-acquired antibodies and vaccination on the immune response to contagious ecthyma virus. Vet. Microbiol. 9: 515-522.

- 13.- Trueblood, M.S. y Chow, T. (1963), Characterization of the agents of ulcerative dermatosis and contagious ecthyma. *Am.J. vet. Res.* 24: 47-51.
- 14.- Guss, S.B. (1980), Contagious ecthyma (sore mouth, orf). *Mod.vet.Pract.* 61 : 335-336.
- 15.- Linnabary, R.D.; Powell, H.; Holscher, M. y Walker, B. (1976), Contagious ecthyma (orf) in a goat herd. *VM/SAC.* 71 : 1261-1263.
- 16.- Kerry, J.B. y Powell, D.G. (1971), The vaccination of young lambs against contagious pustular dermatitis. *Vet. Rec.* 88 : 671-672.
- 17.- Poulain, J.; Gourreau, J.M. y Dautigny, A. (1972), Ecthyma contagieux du mouton: Anticorps seriques neutralisants. *Ann. Rech.véter.* 3: 571-579.
- 18.- Le Jan, C.; Haridon, R.; Madelaine, M. Cornu, C. y Asso, J. (1978), Transfer of antibodies against the CPD virus through colostrum and milk. *Ann.Rech.Vét.* 9 : 343-346.
- 19.- Blood, D.C.; Henderson, J.A. y Radostits, O.M. (1983), *Medicina Veterinaria*, 5ta edí., ED. Interamericana, cáp. 22: 736-738.
- 20.- Trueblood, M.S. (1966), Relationship of ovine contagious ecthyma and ulcerative dermatosis. *Cornell Vet.* 56: 521-526.
- 21.- Snedecor, G .W. y Cockan, G. (1981), *Métodos estadísticos*, 8va edí., Ed. CACSA? México. : 576.