

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**ELABORACION Y CONTROL DE UNA VACUNA
OBTENIDA EN EMBRION DE POLLO CONTRA
LA PAPILOMATOSIS CUTANEA BOVINA DE
ORIGEN VIRAL**

ASESORES:

M. V. Z. AURORA VELAZQUEZ E.

M. V. Z. JUAN GAY

TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
ENRIQUE PEDRO SOTO PORRUA

MEXICO, D. F., 1974



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



100

200-Par 100A - 2nd 90E 1000000

ENRIQUE PEDRO SOTO PORRUA

MEXICO, D. F., 1974

INDICE

	PAG.
1).- INTRODUCCION	2
2).- MATERIAL Y METODOS	5
3).- RESULTADOS	9
4).- DISCUSION Y CONCLUSION	12
5).- BIBLIOGRAFIA.	16

I N T R O D U C C I O N

La Papilomatosis cutánea bovina es una enfermedad de etiología viral y distribución mundial; que afecta principalmente a becerros menores de 2 años. Clínicamente se caracteriza por la presencia de tumores fibrosos en piel y mucosa genitales (1, 5, 13, 15).

En los bovinos la infección natural es -- a través de lesiones epidérmicas, producidas por objetos contaminados con el epitelio queratinizado de las verrugas (1). Debido a lo anterior, los papilomas se localizan en las regiones más expuestas a -- golpes y laceraciones como son: cuello, costado, cara lateral y anterior de los miembros anteriores y posteriores y pecho (15).

El período de incubación es aproximadamente de 30 días (2, 4 y 13), variado extraordinariamente del sistema experimental al natural. La regresión espontánea de las lesiones se presenta de un mes a un año después de producidos los tumores (13).

El proceso regresivo de las lesiones es -- debido a mecanismos inmunológicos de defensa del huésped, tanto inmunidad celular como humoral (18).

Son cuatro los tipos básicos de terapia -
utilizados en esta enfermedad:

- A) Uso de Antimetabolitos (11, 20)
- B) Caústicos (1, 16)
- C) Resección Quirúrgica (1, 16)
- D) Vacunas (5, 10, 15, 16, 17, 19)

Los resultados obtenidos con el uso de -
antimetabolitos (10, 19) son irregulares y de ba-
ja efectividad.

El uso de caústicos (15), es lento e in
seguro, resultando en gran número de casos, lesiones
graves producidas por errores en el manejo del pro-
ducto.

La resección quirúrgica, es de uso común,
aunque frecuentemente va seguida de recidivas. Se
ha intentado el uso combinado de resección quirúrgi-
ca con aplicación de inmunógenos con resultados sa-
tisfactorios (15).

El uso de inmunógenos en el tratamiento -
de la papilomatosis bovina fue utilizado por prime-
ra vez por Biverstein en 1925 (13, 15) el cual --
trató con éxito 14 casos de papilomatosis después -
de aplicar cuatro dosis de 10 ml. de una autovacuna
aplicada con intervalos de una semana.

Aprovechando la fácil replicación del virus en el embrión del pollo se han preparado vacunas de este origen (1, 3, 12, 19). Los resultados son variables sobre todo cuando se utilizan con fines terapéuticos.

Olson y colaboradores (11), hicieron un estudio comparativo entre cuatro vacunas, dos comerciales y dos producidas en su laboratorio, de origen embrión de pollo y de tejido tumoral, encontrando que las vacunas comerciales resultaron menos efectivas que las producidas en el laboratorio y de éstas, la preparada con tejido de verruga resultaba ligeramente más efectiva que la preparada en embrión de pollo.

La literatura contiene un elevado número de reportes sobre el uso de vacunas para el tratamiento de verrugas en el ganado (5, 10, 15, 17, 19), ya sea con fines profilácticos ó terapéuticos. El objeto de este trabajo es la elaboración de un inmunógeno producido en embrión de pollo y su valoración terapéutica en condiciones de campo.

- MATERIAL Y METODOS -

VIRUS. Se utilizó como inoculum para la producción de vacuna una cepa de virus de papiloma de bovinos, provenientes de los estados de Tlaxcala, Puebla y Veracruz, conservados en glicerina fosfatada y en refrigeración, proporcionados por el laboratorio de Virología de la F.M.V.Z. de la U.N.A.M.

Se utilizaron 24 becerros machos cuyas edades fluctuaban entre los 9 y los 12 meses de edad. 21 mostraban síntomas clínicos de papilomatosis bovina, 6 de raza Holstein proporcionados por el Rancho Cuatro Milpas de F.M.V.Z. de la U.N.A.M. y 15 animales - cruza Criollo Cebú y Suizo proporcionados por el Rancho Cuixmala. 3 animales sanos proporcionados también por este último rancho.

Los 21 becerros fueron divididos en 6 grupos de la siguiente manera :

Grupo I	2	becerros raza Holstein			
Grupo II	"	"	"	"	"
Grupo III	"	"	"	"	"
Grupo IV	5	"	cruza Criollo Cebú Suizo		
Grupo V	"	"	"	"	"
Grupo VI	"	"	"	"	"

Al grupo I y IV se les aplicaron 10 ml. de vacuna por vía subcutánea en un lado de la tabla del

cuello.

Al grupo II y V les fueron aplicados 10 ml. de vacuna por vía subcutánea fraccionándola en dos y depositando cada fracción a cada lado del cuello.

Al grupo III y VI no se les aplicó vacuna y fueron considerados control.

La observación clínica de la evolución de las lesiones se realizó diariamente.

2 becerros sanos se les inoculó 10 ml. de vacuna en 2 dosis en 5 ml. cada una a cada lado del cuello por vía subcutánea para la prueba de inocuidad.

Para la prueba de confrontación los becerros utilizados en la prueba de inocuidad y un becerro sano fueron expuestos con la misma dilución utilizada en la inoculación del embrión de pollo. La vía de aplicación fué por escarificación en 20 zonas diferentes de la piel depilada de 20 cm² cada una.

PREPARACION DE LA VACUNA ,

A) Una suspensión de tejido papilomatoso 1:10 en solución salina bufferada (SSB) fué preparada por maceración en mortero de porcelana. La suspensión resultante se colocó en tubos cónicos centrifugándose a 200 r.p.m. durante 10 minutos.

El sobrenadante se separó por decantación y fué tratado con 1000 U.I. de penicilina y 10 mcg. de estreptomycinina por ml. dejándolo en incubación a temperatura

BIBLIOTECA CENTRAL

U. N. A. M.

ra del laboratorio durante 20 minutos.

- B) Cinco embriones de pollo de 10 días de edad fueron inoculados de acuerdo a la técnica descrita por -- Cunningham (6) para la inoculación en membrana -- corioalantoidea (MCA).
- C) A los cinco días post-inoculación, los embriones -- fueron sacrificados por refrigeración a 4°C.
- D) Siguiendo la técnica de Cunningham (6) fueron co-- sechadas las MCA y colocados en cajas Petri conte-- niendo SSB estéril para observar la presencia de -- lesiones.
- E) Las membranas que exhibieron lesiones fueron pesa-- das y preparadas en forma similar a la detallada -- en el inciso A, sólo que en este caso se utiliza-- ron morteros de Tembrock.
- F) Con el material obtenido se inocularon 100 embrio-- nes de pollo de 10 días de edad según técnica de -- Cunningham (6).
- G) A los cinco días post-inoculación los embriones -- fueron sacrificados por refrigeración, cosechando-- las MCA colocándolas en congelación a -20°C.
- H) Las MCA obtenidas según Cunningham (6) fueron -- maceradas y suspendidas en SSB estéril a una dilu-- ción de 1:20. Una parte de esta dilución fué utili

zada en la inoculación de 40 embriones de pollo de 10 días de edad para la titulación del virus por el método de Reed y Muench según Cunningham (6), la otra parte fué sometida a ultrasonido 35. a ciclos/ seg. durante 5 minutos. Finalmente la suspensión se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 10 minutos. El líquido sobrenadante fué colocado por decantación en un matraz estéril, adicionando formaldehído a una concentración final de 0.5% e incubando 72 horas a 37°C.

I) Muestras del sobrenadante formolizado fueron inocu-
ladas en cinco embriones para probar su inocuidad-
y en medios de tioglicolato y agar sangre para co-
rroborar su esterilidad.

J) El inmunógeno fué envasado en frascos estériles de
50 ml. y almacenado a -70°C.

Se utilizó la técnica de precipitación en agar se-
gún Kabat (7) para la detección de anticuerpos.-
Como antígeno se utilizó macerado de papilomas de-
los cuales se aisló el virus. Y como anticuerpo el
suero obtenido de muestras sanguíneas 7 días des-
pués de la inoculación de los animales vacunados a
intervalos de 7 días hasta 14 días después del des-
prendimiento total de los papilomas.

- RESULTADOS -

El título DIE 50% fué $10^{-8}/0.2$ ml.

Los resultados obtenidos de la aplicación del inmunógeno aparecen en el cuadro No. 1, notándose una reacción inflamatoria y con hiperestesia. Esta reacción fué mayor en los animales del grupo I y IV, persistiendo la lesión tres semanas, que en los del grupo II y V que fué de una semana.

Los primeros signos de regresión de los tumores, consistieron en aumento aparente de volumen de su masa y disminución en su adherencia a la piel. Estos signos se presentaron entre los 7 y 11 días post-inoculación para los animales del grupo I y IV y a los cinco días para los del grupo II y V. 15 a 21 días después sobrevino el desprendimiento de las verrugas dejando zonas alopécicas con cicatrices ligeras que se cubrieron con el pelo adyacente a los pocos días.

Los animales de los grupos control no mostraron ninguna modificación clínica de sus lesiones a lo largo de 180 días que duró el experimento.

Los animales utilizados en la prueba de inocuidad mostraron ligera reacción local postvacunal en el sitio de aplicación y que desapareció una semana después. No se observó en ellos presencia de papilomas 30 días después de la inoculación lo que demostró

la ausencia de partículas virales activas en el inmunógeno utilizado.

Los 2 becerros, que fueron utilizados para la prueba de inocuidad y otros más sin inocular, fueron expuestos con una dilución 1:10 del papiloma del cual se aisló el virus en el embrión de pollo. Estos animales no mostraron ninguna reacción local en el sitio de la inoculación, ni general después de 2 meses de aplicación. El animal control no vacunado fué inoculado en la misma forma que los anteriores mostrando después de 15 días evidencia de crecimiento de papilomas los que fueron aumentando de tamaño lo que manifiesta la protección que confirió la vacuna.

El resultado de las pruebas de precipitación - en agar realizadas con muestras séricas prelevadas antes del desprendimiento total de los papilomas fueron negativas y las prelevadas 7 y 14 días después del desprendimiento total fueron positivas (8) .

RESULTADOS OBTENIDOS DE LA APLICACION DEL INMUNOGENO

GRUPO	Número ó arete	Reacción local post-vacunal	Primeros síntomas regresión post-vacunal	Desprendimiento post-vacunal
I	886	++	7 días	15 días
	871	++	11 "	21 "
II	882	+	5 días	21 días
	896	+	" "	15 "
III	894	-----	-	-
	897	-----	-	-
IV	21	++	10 días	21 días
	22	++	9 "	21 "
	23	++	9 "	15 "
	24	++	8 "	30 "
	25	++	7 "	15 "
V	30	+	5 días	15 días
	31	+	" "	17 "
	32	+	" "	20 "
	33	+	" "	21 "
	34	+	" "	18 "
VI	42	-----	-	-
	43	-----	-	-
	44	-----	-	-
	45	-----	-	-
	46	-----	-	-

Grupo Control.

- DISCUSION Y CONCLUSIONES -

El virus se aisló facilmente de la capa córnea de los papilomas obteniéndose un 60% de embriones con lesiones en el primer pase, un 100% al segundo, - de donde se tomaron las MCA para la preparación de la vacuna. Olson y Cols han hecho varios trabajos sobre vacunas contra la papilomatosis bovina (9) (10) - (11) (13) (14). En estos trabajos se obtuvieron muy diversos resultados indicando que las vacunas comerciales no dieron buenos resultados y que las vacunas producidas en su laboratorio dieron resultados variables; las vacunas hechas a base de papilomas e inactivadas con formol daban resultados variables, atribuyéndose ésto a que la confrontación se hizo posiblemente con otros virus que no eran los que dieron origen a los papilomas. Ellos no toman en consideración el número de partículas víricas que pudieron estar presentes en su producto inmunizante. En este trabajo la concentración de tejido infectado fué del 20% y el título $DIE_{50\%}$ fué $10^{-8}/0.2$ ml. lo cual garantizó gran concentración de antígeno en la vacuna. Al analizar los trabajos de Olson y Cols a los que ya se han hecho referencia se puede encontrar que únicamente en aquellas ocasiones en que la dosis total de tejido infectado era cercana a los 2 g. se producían resultados satisfactorios, pero como se desconoce el título-

de los virus empleados no se pueden hacer comparaciones con el presente trabajo.

En un primer intento para probar la inocuidad de la vacuna en bovinos se inocularon 2 becerros sanos con 10 ml. de la misma por vía subcutánea en la tabla del cuello. En estos animales se produjo -- una reacción inflamatoria muy severa que consistió -- en la aparición de un granuloma en el sitio de la -- inoculación con un diámetro aproximado de 20 cm. el cual tardó en desaparecer aproximadamente 3 semanas.

Alrededor de la zona inflamatoria había hiperestesia y los animales estaban inquietos y ligeramente anoréxicos aunque no se observó en ellos aumento de la temperatura rectal. Por estas razones se decidió fraccionar la vacuna para aplicarla en 2 sitios con lo cual la reacción inflamatoria local fué mínima.

A pesar de que en algunas vacunas comerciales existe la recomendación de aplicarlas en dosis de 25 ml. en 2 ocasiones por vía subcutánea y con un reforzamiento de 2 ml. por vía intradérmica, en este trabajo se decidió aplicar únicamente una dosis de 10 ml. con centración de tejido infectado al 20% porque representaba un estímulo antigénico -- mucho muy abundante. 2 becerros sanos que fueron u-

tilizados para la prueba de unocuidad y otro más sin inocular, fueron expuestos con una dilución 1,10 del papiloma del cual se aisló el virus en el embrión de pollo. La inoculación se hizo por escarificación de 20 mm² cada una. Encontrándose en los 20 sitios de inoculación del animal no vacunado presencia de papilomas y ausencia completa de papilomas en los vacunados 3 meses después de haberse expuesto al virus. Esto puede interpretarse con las limitaciones de un número pequeño de animales, como que el inmunógeno protegió muy efectivamente al virus de confrontación.

Ya se mencionó que algunas fallas de la vacunas podían atribuirse al uso de una virus de confrontación, aunque de origen bovino, que pudiera ser diferente al que dió origen a la vacuna. En este trabajo el virus fue aislado de papilomas de cebús de los estados de Tlaxcala, Puebla y Veracruz y la vacuna preparada con este virus mostró una acción terapéutica contra la papilomatosis de becerros raza -- Holstein y cruce Criollo Cebú y Suizo, lo que demuestra que posiblemente la papilomatosis bovina en México es producida por sólo un tipo de virus.

7 días después de la aplicación de la vacuna con fines terapéuticos, se obtuvieron muestras sanguíneas de los animales vacunados a intervalos de 7

días hasta 14 días después del desprendimiento total de los papilomas. Se obtuvo el suero de las muestras sanguíneas y se intentó poner de manifiesto la presencia de anticuerpos en esos sueros por medio de precipitación en agar utilizando como antígeno macerados de los papilomas de los cuales se aisló el virus para evitar la posible detección de otros antígenos que pudieran estar presentes en la MCA de embrión de pollo. En estos experimentos se encontró que no había ó que no se pudieron detectar anticuerpos antes de que ocurriera el desprendimiento total de los papilomas; pero se detectaron anticuerpos fácilmente una vez que ésto había ocurrido. La interpretación de estos resultados puede explicarse si se considera que la inmunidad conferida es de tipo celular por lo que se sugiere que se hagan más investigaciones para confirmarlo.

- BIBLIOGRAFIA -

- 1.- ANDREWES, Ch.; "Virus of Vertebrates"; Bailliere, Tindall & Cox., Ltd. pag. 196-210, 1973.
- 2.- ASHKENAZI, A.; and MELNICK, J.L.; "Induced Patent Infection of Monkeys with Vacuolatin SV40 Papovavirus in Kidney and Urine". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 3 - 718-722, (1969)
- 3.- BLOOD, D. Ch.; and HENDERSON, V.A., 3rd. "Medicina Veterinaria" Ed. Interamericana pag. 541, 543, 1969.
- 4.- BROST, D.F. and DULAC, G.C.; "Meningeal Tumors Induced in Calves" The bovine Cutaneous Papilloma Virus" Pat. Vet. 6 - 135-145, (1969)
- 5.- CORNELIUS, CH. E.; WILTZOWSK, V.A.; and WOOD, M.G. "Viral verruga human papovavirus infection" Arch Derm. 98 - 377-384, (1968)
- 6.- CUNINGHAM, CH. H.; 6th. "Laboratory Guide in Virology" Burgess Publishing Co. pag. 23-30- 1966.
- 7.- KABAT AND MAYER'S "Experimental Immunochemistry" 2nd. Ed., Manfred Mayer pag. 79-82 y 83-85, 1961.
- 8.- LEE, K.P.; and OLSON, C.; "A gel diffusion precipitation Test for bovine Papilloma Virus" M.A.V.M.A. - - - 30-725-731 (1969)
- 9.- OLSON, C.; and SKIDMORE, L.V.; "Terapy Experimentally Produced Cutaneous Papillomatosis with Vaccines and Excisión" Cancer Research, 15 - 339-342, (1959)
- 10.- OLSON, C.; SEGRE, D.; and SKIDMORE, L.V.; "Immunity to Cutaneous Papilomatosis" J.A.V.M.A. 135 - 499-502 (1969)
- 11.- OLSON, C.; SEGRE, D.; and SKIDMORE, L.V. "Immunity to Cutaneous Papillomatosis" Am. Journal Vet. Res. 21 - 233-242 1960.
- OLSON, C.; GORDON, E.D.; ROBL, M.E.; and LEE, K. "Onco genicity of Bovine Papilloma Virus", Arch. Env. Health, 1 - 827-837, (1969)

- 13.- OLSON, C.; LUEDKE, A.J.; and BROST, D.F.; "Induced Immunity of Skin, Vagina and Urinary Bladder"; Cancer Research 22 - 464-468, (1962)
- 14.- OLSON, C.; ROBL, M.E.; and LARSON, L.L.; "Cutaneous and Penile Bovine Fibropapillomatosis and its Control"; J.A.V.M.A. 153 - 1189-1194 (1968)
- 15.- ORME, S.K.; WELLS, S.A.; RABSON, A.S.; and Wurtman, R.J.; "In Vitro Neoplastic Transformation of Hamster Pineal Cells By Three Oncogenic DNA Viruses"; Cancer, 21 -477-482, (1968)
- 16.- QUIN, A.H.; "Autogenos Wart Vaccine"; Vet. Med. 53-207 (1963)
- 17.- TOMKINS, W.A.; CROUCH, N.A.; TEVETHIA, S.A.; and -- RAWL'S, W.E.; "Characterization of Surface Antigen on Cells Infected By Fibroma Virus"; Jour of Immunology, 105 -1181-1188 (1970)
- 18.- RABSON, A.S.; and KIRSCHSTEIN, R.L.; "Induced of Malignancy in Vitro in Newborn Hamster in Kidney Tissue Infected With Simian Vacuolating Virus SV40" P.S.E.B.M. 8-323-328- (1962)
- 19.- SMITHCORS, J.F.; and CATCOTT, E.J.; "Progress in - - Cattle and Sheep Practice"; Wheaton, American Veterinary Publication Tomo I Pag. 69-70 - (1968)