



11661  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

CARACTERIZACION ANTIGENICA DE  
PARAPOXVIRUS EN MEXICO

P R E S E N T A:  
SOFIA GONZALEZ GALLARDO  
PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS  
(AREA MICROBIOLOGIA)

TESIS CON  
FECHA DE ORIGEN

Director: Dr. Jorge Luis Tortora Pérez

1992



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.

LISTA DE CUADROS

CUADROS	PAGS.
1	Origen de las muestras de parapox, utilizadas en este estudio 34
1a	Pruebas bioquímicas de identificación de bacterias contaminantes 53
2	Resultados de la prueba de IDD con suero de conejo inmunizados con la muestra de referencia 58
3	Relación de muestras con diferentes número de bandas de identidad por IDD 59
4	Resultados de la prueba de CIE con suero de conejos inmunizados con la muestra de referencia 60
5	Formas de parapox presentes en las muestras estudiadas por inmunomicroscopía electrónica 63
6	Número de formas de parapox por IME 64
7	Patrones electroforético presentes en las muestras de parapoxvirus 66
10	Patrones electroforéticos de 14 muestras de E.C., una muestra de EPB y una de EPB 68
11	Pesos moleculares de las proteínas de muestras de EC en base a especie afectada 69
12	Pesos moleculares de las proteínas de las muestras de EC, agrupadas en base a fecha de brote 70
13	Pesos moleculares de las muestra de EC en base a lugar de origen 71
14	Proteínas reconocidas por el suero inmune 73
15	Frecuencia de las proteínas presentes en los patrones electroforéticos de los diferentes muestras de parapox 74

## LISTA DE FOTOS Y FIGURAS

Figura		Pag
foto 1	Suero de conejo titulado por IDD y CIE	54
foto 2	Resultados de las muestras de parapox por IDD	56
Foto 3	formas de parapox por IME	51
Fig.1	Patrón electroforético de los virus de ectima contagioso	65
Fig.2	Electroforesis de muestras de parapox	67
Fig.3	Patrones electroforéticos por inmunotransferencia	72

#### ABREVIATURAS

ABS:	Albúmina Sérica Bovina
CIE:	Técnica de Contrainmunolectroforesis
EC:	Virus de Ectima contagioso.
Elisa:	Técnica de inmunoensayo enzimático.
EPB:	Virus de Estomatitis papular bovina
IDD:	Técnica de Inmunodifusión.
IME:	Técnica de Inmunomicroscopía Electrónica.
MEM-EAGLE:	medio de cultivo celular
PBS:	Amortiguador de fosfatos
PP:	Virus de Ectima contagioso tratado con sulfato de amonio
Prot.	Proteína
PVB:	Virus de Pseudoviruela bovina.
SDS:	Dodecilsulfato de sodio.
UC:	Virus de Ectima contagioso centrifugado a 30000 Xg

#### Abstract.

The techniques of Gel Diffusion (GD), Counterimmunoelectrophoresis (CIE), and Immunoelectron Microscopy (IEM) were used to examine the antigenic relations of 32 ovine and caprine Contagious Ecthyma Virus (CEV) strains, obtained from different outbreaks in Mexico, one Bovine Papular Stomatitis Virus (BPSV) strain, one Milkering Node Virus (MNV) strain, and one Avipox Virus (APV) strain. In the GD and CIE techniques, the viruses reacted with an Hyperimmune rabbit Serum (HIS), made with one caprine CEV strain (standard strain). The HIS reacted with the standard strain and determined three precipitation lines in the GD and CIE techniques. The MNV strain, BPSV strain, and the standard strain of CEV showed one identity line when they reacted with the HIS. Three CEV strains showed two identity lines with the standard strain and five CEV strains showed only one identity line with it. The results obtained by GD and CIE techniques seem to confirm some antigenic homogeneity in the parapoxviridae in Mexico, even in strains of different species. With the IEM technique there were not found differences between the parapox strains, because there were observed particles with and without antibody coats in the same strain.

Using polyacrylamide gels, there were made the electrophoretic runs of 15 ovine and caprine CEV strains, one of the MNV strain, and one of the BPSV strain suspensions. In seven strains it was also made immunoblotting using the HIS. The number of obtained proteins was between 4 and 12 depending on the strain. Two proteins, one of 55 kd and the other of 9.5 kd were common to all strains, one of 17 kd was observed in 12 strains, other of 35 kd in 10 strains and another of 15 kd in 8 strains. The bovine MNV and BPSV strains showed in common with the CEV strains the 55, 17, and 9.5 kd proteins.

In the immunoblotting technique used in six CEV strains and the MNV strain, the recognized proteins by the HIS were in the range of 63 to 23 kd. These proteins probably correspond to the surface antigens, particularly of the filament. The 55 and 59 kd proteins were recognized by the HIS and in the electrophoretic runs were common to parapox. The results confirm the relation between CEV and bovine viruses strains, even for antigens that stimulate antibody response.

## RESUMEN

Se examinaron mediante las técnicas de inmunodifusión (IDD), contrainmunolectroforesis (CIE), e inmunomicroscopía electrónica las relaciones antigénicas de 32 cepas de ectima contagioso (EC) de origen ovino y caprino, obtenidas de diferentes brotes en México, incluyéndose además una muestra de Estomatitis papular bovina (EPB), una de Pseudoviruela Bovina (PVB) y una de viruela de paloma. Por las técnicas de IDD y CIE, los virus reaccionaron con un suero hiperinmune de conejo (SHI), elaborado con una cepa de origen caprino de EC, (cepa patrón). El SHI reaccionó con la cepa patrón, y determinó tres líneas de precipitación en IDD y CIE. Las cepas de PVB, EPB y la cepa patrón de EC presentaron una línea de identidad al reaccionar con el SHI. Tres muestras de EC evidenciaron dos líneas de identidad con la cepa patrón y cinco una sola línea con ésta. Los resultados obtenidos por IDD y CIE, parecen confirmar cierta homogeneidad antigénica en los virus del género parapoxviridae (parapox) en México, incluso entre cepas de distintas especies. Sin embargo por la técnica de inmunomicroscopía electrónica, no se encontraron diferencias entre cepas de parapox, pues dentro de la misma muestra se observaron partículas con corola y sin corola de anticuerpos.

Utilizando geles de poliacrilamida se realizaron las corridas electroforéticas de suspensiones de 15 cepas de EC, de origen ovino y caprino, una de PVB, y una EPB. En siete muestras se realizó además inmunotransferencia empleando SHI. El número de proteínas obtenidas varió de 4 a 12 según la cepa, dos proteínas, una de 55 Kd y otra de 9.5 Kd fueron comunes a todas las cepas, una de 17 Kd se observó en 12 cepas, una de 35 Kd en 10 cepas y una de 15 Kd en 8 cepas. Las cepas bovinas de PVB y EPB presentaron en común con las cepas de EC las proteínas de 55, 17 y 9.5 Kd.

Por la técnica de inmunotransferencia realizada a 6 cepas de EC, y una de PVB, las proteínas reconocidas por SHI, se localizan en el rango de 63 Kd a 25 Kd; estos proteínas corresponden probablemente a los antígenos de superficie, particularmente de filamento; las proteínas de 55 y 54 Kd son proteínas que reconoció el SHI y que en los patrones electroforéticos fueron comunes al género de parapox. Los resultados confirman la relación existente entre cepas de EC y con los virus bovinos, incluso para antígenos que estimulan respuestas de anticuerpos.

## INDICE

### I. INTRODUCCION

I.1.- Taxonomía.....	1
I.2.- Morfología.....	2
I.3.- Replicación del virus.....	7
I.4.- Serotipos y/o Biotipos .....	9
I.5.- Relación entre parapoxvirus (Parapox).....	14
I.6.- Transmisión .....	15
I.7.- Patogenia .....	18
I.8.- Lesiones .....	19
I.9.- Localización.....	21
I.10.- Respuesta Inmune .....	24
I.11.- Diagnóstico .....	29
2. HIPOTESIS.....	31
2.1. Objetivos.....	32
3. MATERIAL Y METODOS.....	33
3.1.- Preparación de las muestras de prueba y muestra de referencia.....	34
3.2.- Obtención de sueros hiperinmunes.....	35
3.2.1.- Animales.....	35
3.2.2.- Suspensión Viral.....	35
3.2.3.- Calendario de Inmunización.....	35
3.2.4.- Evolución y titulación del suero.....	35
3.3.- Inmunomicroscopía Electrónica (IME).....	36
3.4.- Contraelectroforesis (CIE).....	36
3.5.- Inmunodifusión (IDD).....	37



3.6.- Concentración de Proteínas Virales.....	38
3.6.2.- Soluciones de trabajo.....	39
3.7.- Cuantificación de Proteínas.....	39
3.9.- Adsorción de Suero.....	40
3.10.- Aislamiento de Bacterias.....	41
3.11.- Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodesilsulfato de sodio (SDS-PAGE).....	41
3.11.1. Preparación de Muestras.....	42
3.11.2. Preparación de Geles.....	42
3.12.-Inmunotransferencia.....	43
4.- RESULTADOS.....	46
4.1.- Obtención de Sueros Hiperinmunes.....	46
4.2.- Reacciones de identidad de Ectima contagioso por pruebas de inmunodoble difusión y contrain- munolectroforesis.....	46
4.4.- Inmunomicroscopia Electrónica.....	48
4.5.- Patrones electroforéticos.....	49
4.6.-Inmunotransferencia.....	51
5.- DISCUSION.....	75
APENDICE I.....	85a
APENDICE II.....	85b
APENDICE III.....	85c
6.- BIBLIOGRAFIA.....	85

## INTRODUCCION

Parapoxvirus (paravaccinia).

### I.1- Taxonomía:

De acuerdo al tercer reporte del Comité Internacional de taxonomía viral (Matthews, 1982), los virus de ectima contagioso (sinónimos: virus de ORF, virus de dermatitis pustular contagiosa), estomatitis papular bovina (sinónimos virus de estomatitis papulosa) y virus de la pseudoviruela bovina (Sinónimos: virus de pseudocowpox , nódulo del ordeñador) son considerados dentro del género parapoxvirus. Todos los virus del género son capaces de producir lesiones al hombre, caracterizadas básicamente por la formación de pápulas, vesículas y pústulas pruriginosas, principalmente en las extremidades superiores, que en casos excepcionales pueden llegar a ser incapacitantes (Robinson y Peterson, 1983; Gassmann y Wittek 1985).

El comité Internacional, clasificó a este genero como miembro de Familia POXVIRIDAE, subfamilia Chordopoxviridae, género parapoxvirus; (cada género se estableció según sus antígenos comunes, además del antígeno nucleoproteico común a todos los Poxvirus, y por su capacidad de recombinarse genéticamente); además señala como características comunes al género: el presentar ADN

doble cadena, peso molecular de  $85 \times 10^6$ , viriones ovoides de 220-300 nm x 140-170 nm, con cubierta externa y la presencia característica de un filamento externo grueso, ordenado en una espiral regular, con lo que adquieren una morfología muy particular al ser observados en microscopía electrónica. (Matthews, 1982).

La simetría de la cápside es compleja y la envoltura de naturaleza lipoproteica. Se multiplica y madura en el citoplasma de la célula animal (a diferencia de otros virus ADN) y las partículas maduras se liberan por brote o por ruptura celular.

El contenido de guanina-citosina varía de 35% a 40%; forman cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos observables con el microscopio óptico, en preparaciones teñidas con hematoxilina eosina; y en el microscopio electrónico se puede visualizar se forma estructural típica, los miembros de este género muestran reacción cruzada, y las células infectadas no producen hemaglutinina. Los virus pueden infectar al hombre. (Matthews, 1982).

## I.2. Morfología:

La morfología y estructura de los distintos integrantes del género parapoxvirus, no permite establecer diferencias distintivas entre

ellos a la observación de microscopía electrónica, (Nightington y cols. 1965 y 1967, Peters y cols. 1964), aunque si es lo suficientemente particular, para distinguirlos de los demás géneros de la familia poxviridae (Peters y cols., 1964).

La observación del virus con tinción negativa utilizando ácido fosfotúngstico, permite distinguir dos tipos diferentes de partículas: unas impermeables al fosfotungstato y de superficie estriada, formas M ó tipo 1; y otras permeables al fosfotungstato en las que se puede apreciar el nucleóide y las complejas cubiertas del virus, de superficie lisa y generalmente de mayor tamaño que las primeras, formas C o tipo 2. La presencia de estos dos tipos de partículas en las muestras de tinción negativa, es un elemento común a toda la familia poxviridae, (Peters y cols., 1964; Mitchiner, 1969).

El uso de gradientes 25-50% de ditrizoato de Sodio, permite separar en dos bandas los dos tipos de partículas. La banda más nítida y densa corresponde a las partículas de tipo 1(M), mientras que las partículas tipo 2(C) aparecen en una segunda banda por debajo de la primera en forma difusa; su diferente densidad ha sido interpretada como una consecuencia de la diferente permeabilidad de las partículas al material del

gradiente. Mientras que las partículas de tipo 1 conservan infectividad, las del tipo 2 parecen corresponder a viriones dañados, no infectantes, lo que permitiría explicar su permeabilidad al fosfotungstato, (Robinson y cols., 1982); pero el interpretar a las partículas de tipo 2 como viriones dañados, no parece en principio una idea refutada con las observaciones anteriores.

En las formas M, se aprecia en forma característica la presencia de una estructura "filamentosa" que rodea a la partícula viral y le confieren, por su particular disposición, el aspecto de " ovillo " que distingue a este género viral. El espesor de este filamento ha sido estimado en 8-12 nm (Peters y cols. 1964 Nagington y cols 1965), mientras que su longitud ha sido calculada en 8-10 micras, en función de los modelos propuestos por Nagington y cols. en 1965. En los modelos construidos para explicar el ordenamiento del filamentos, de acuerdo con las observaciones de microscopía electrónica, este se orienta en forma paralela entre sí y oblicua de acuerdo al eje mayor de la partícula, (Nagington y cols., 1965).

Las formas M y su filamento se observan en mayor proporción y con más claridad, cuando la tinción con fosfotungstato se realiza a pH ácido o

neutro, mientras que con pH alcalino de más de 10.5, se favorece la observación de partículas C y en consecuencia de las estructuras internas de la partícula, (Peter y cols, 1964; Nagington y cols 1965; Mitchiner 1969). En estos casos se distingue un cuerpo interno compuesto por tres filamentos de aspecto tubular, de 1800 A de largo u unos 300 A de ancho. Esta tripleta se presenta rodeada de una matriz densa y ocasionalmente con forma de S al ensancharse en los extremos. Entre las proteínas periféricas y la cubierta viral se puede distinguir una doble estructura densa ( Peters y cols. 1964; Nagington y cols 1965).

El uso de enzimas de restricción en el análisis del ADN de los parapox, ha demostrado además de sus cualidades fisicoquímicas, la existencia de una considerable heterogéncidad entre las muestras de diferente origen, o aún entre las que siendo del mismo origen difieren en el número de pases celulares recibidos. (Wittek y cols., 1980; Robinson y cols. 1982).

El virus de Estomatitis papular bovina contiene un 90% de proteína, lípidos en un 5%, DNA 3%, pero para los otros miembros del género parapoxvirus (ectima contagioso y Pseudoviruela bovina) no se han realizado estudios respecto a la composición proteica.

En el virus de ectima contagioso, el uso de electrofóresis en poliacrilamida ha permitido separar nítidamente unos 40 polipéptidos, con pesos moleculares distribuidos entre 10,000 y 200.000, estas corridas comparadas en iguales condiciones con vacuna (vaccinia), son claramente diferentes en su composición en cuanto a cantidad y tamaño de los polipéptidos detectados. En este mismo estudio, el uso combinado de microscopía electrónica con las corridas del gel, permite identificar a una proteína de 45000 dalton (45K), como el probable componente estructural de los filamentos que rodean a las partículas, (Thomas y cols 1980).

Mediante el uso combinado de solventes y distintos sistemas enzimáticos (tripsina, quimiotripsina, DNAsa, lipasa, y fosfolipasa A), Mitchiner (1969), propuso que la cubierta externa del virus es de naturaleza proteo-lipídica, mientras que la interna parece estar conformada predominantemente por proteínas, aunque quizás también asociadas a fosfolípidos y triglicéridos, de acuerdo con estos estudios, el autor propone un posible modelo de ordenamiento molecular.

### I.3. Replicación del virus:

Es poca la información disponible que permita componer un modelo de replicación para los parapox, dada la ausencia de trabajos a nivel bioquímicos o molecular.

Thomas y cols. (1980), utilizando el virus de la estomatitis papular bovina, aporta algo de información en este sentido. Utilizando timidina tritiada los autores demuestran el inicio de síntesis de ADN viral 4-8 horas PI, al mismo tiempo que se bloquea la síntesis de DNA celular, esta actividad se prolonga hasta las 30-36 horas PI. La sedimentación conjunta de partículas de metionina marcadas con azufre 35 y timidina tritiada, como indicadores de partículas virales de nueva formación se inicia a las 20-24 horas PI y esto coincide con las observaciones de microscopía electrónica. Pese a lo anterior Pospischil y Bachmann (1980), comunican la observación de partículas maduras de ectima a las 16 horas PI.

Flowright y cols, (1959), titulando el sobrenadante de cultivos celulares, detecta un incremento del título a partir de las 8-12 horas PI y delimitan de esta manera el período de "eclipse" del virus de ectima.

Dhaval Kumar y Pickup (1989) al estudiar las fallas de la replicación de los poxvirus, encuentran que el gen viral esta transcrito por una RNA polimerasa



dependiente de DNA; y esta enzima esta formada por siete subunidades, cuyas masas estan estimadas entre: 147, 130, 73, 37, 23, 22, y 20 Kd, las cuales son muy similares a las de la polimerasa de eucariotes. Debido a la accesibilidad de los genes de Poxvirus y su relativa simplicidad en los sistemas transcripcionales, estos son estudiados como modelo en el estudio de las subunidades de la RNA polimerasa.

Dhaval y cols (1989), al estudiar el gen designado rpo 132 de los parapox virus, localizado en la segunda subunidad de la enzima RNA-polimerasa, esta formado por una subunidad de la enzima viral de RNA polimerasa dependiente de DNA, que en el ciclo de multiplicación viral en la transcripción presenta dos sitios transcripcionales, uno operativo tardío y otro operativo temprano; siendo interesante la presencia de la secuencia 5'-TTTTTAT-3', en la región del codón del gen rpo 132; esta secuencia puede ser la responsable de la prematura terminación en la transcripción temprana del gen; y al parecer esta involucrada en procesos de reconocimiento del promotor, unión al substrato y elongación de la cadena de RNA (Glass y cols, 1986; Godovikova 1987, Hanggi 1986; citados por Dhaval y cols. 1989) gran subunidad de DNA-dependiente de RNA polimerasa viral, es el gene designado rpo 132 de los capripoxvirus; el cual es transcripto a través del ciclo de multiplicación viral, presentando dos sitios

transcripcionales: uno operativo tardío y otro es operativo temprano y tardío al mismo tiempo.

Los estudios de ultraestructura señalan una muy clara similitud entre las imágenes de replicación de los parapox y el virus de vacuna (vaccinia perteneciente al género de orthopoxvirus). Este último ha sido ampliamente utilizado como modelo en los estudios de replicación para los parapox. La síntesis de ADN en vacuna se inicia a las 1.5-2 horas PI y las partículas de nueva formación son detectables a las 6 horas, (Fenner y cols., 1974). De seguir estos mismos patrones de replicación los parapox serían en consecuencia "más lentos" que vacuna.

#### I.4. Serotipos y/o Biotipos

Diferentes elementos apoyan la posibilidad de la existencia de serotipos y/o biotipos de estos virus. Los primeros trabajos en este sentido, utilizando pruebas de protección cruzada en ovinos vacunados y susceptibles, demostraron la identidad entre cepas de origen inglés y australiano, (Seddon y McGrath 1931 citados por Sawny, 1966b) y en tres muestras de origen francés, inglés y californiano, Glover 1933 (citado por Wittek R; y cols 1980) reconoce en su trabajo, que los resultados obtenidos al comparar las muestras de cabras chipriotas, no fueron concluyentes respecto a su identidad inmune con las muestras ovinas. Sin embargo

Horgan y Hasseb 1947 (citado por Hussain y cols.; 1989) examinaron una serie de cepas y encuentran que algunas cepas son inmunológicamente idénticas mientras que otras aparecen relativamente poco diferentes; por lo que concluyen que las diferencias serológicas son mínimas.

La multiplicación del virus en membrana corioalantoidea es incostante y pudiera depender de las cepas empleadas. El virus de ORF no crece normalmente en membrana corioalantoidea, algunas cepas producen focos sobre la membrana corioalantoidea y otras no lo producen, y se pierden después de tres pases consecutivos en embrión de pollo. (Lyelland y Miles 1950, Greig 1956, Abdussalam 1957; citados por Nagington 1961). El virus de ectima contagioso no produce lesiones en ratón, conejo y cuye. (Naginton 1961)

En sus intentos por establecer diferencias y semejanzas entre ectima contagioso y dermatitis ulcerativa ovina, Trueblood (1966), concluye que probablemente se trata del mismo virus con variantes antigénicas en cada enfermedad. Pese a que en trabajos anteriores había concluido que se trataba de diferentes virus, por no presentarse protección cruzada, (Trueblood y cols., 1963).

Posteriormente Sawhney (1966), comparó los diferentes aislamientos de ectima contagioso con neutralización y protección cruzada y demuestra la existencia de diferencias antigénicas entre lo que

considera corresponden a dos grupos de diferente origen geográfico, por un lado una cepa Inglesa y una Búlgara y en el otro una Rumana con una Checoslavaca. De las cepas ensayadas solo la Inglesa y la Búlgara forman cuerpos de inclusión; señalando la posible existencia de una gran variabilidad antigénica entre las cepas de campo.

Nagington en 1968, encuentra que algunas cepas son capaces de crecer en un amplio rango de células de cultivo primario; y al ser examinadas durante los primeros pases en cultivo celular, pierden especificidad para las células de borrego y se multiplican en células heterólogas de origen humano, esta poca especificidad también fue encontrada en cetas de borregos, que habían producido infección natural en humanos, lo que sugiere la pérdida de especificidad de la cepa procedente de infección humana.

Corroborando esto Liebermann 1966 (citado por Wittek 1980) menciona que después de una serie de pases en cultivo celular la mayoría de cepas de ectima contagioso, tienen poca especificidad para células de borrego y parecen tan heterogéneas como las procedentes de lesiones que aparecen en humano. (Liebermann 1966 citado por Wittek 1980).

En similar situación, Precausta y Stellman (1973) estudiando cuatro aislamientos de origen Francés y uno de origen Iraní; encuentran que una de las cepas

Francesas presenta un subtipo antigénicamente diferente a los otros tres de origen Francés; consideran que es posible establecer por lo menos dos subtipos del virus, aunque con importantes parentescos antigénicos entre ellos.

Wittek, y cols. (1980); estudian seis muestras de estomatitis papular bovina y tres muestras de ORF, y realizan la comparación por serología y análisis de DNA tratado con enzimas de restricción. El estudio de la cinética de neutralización reveló gran reactividad cruzada entre las cepas, pero no permitió una clasificación y mientras que el análisis de DNA por enzimas de restricción reveló la existencia de estrechas relaciones entre cepas de estomatitis papular y ORF y tres grupos muy heterogéneos, luego de 137 pases en cultivo celular.

Además Buddle y cols. (1984), mencionan la ausencia de inmunidad cruzada en pruebas de seroneutralización; con diferentes cepas de ectima contagioso.

Las aparentes contradicciones entre los resultados presentados por Seddon, McGrath y Glover (1933), (citados por Wittek 1980) con los de Sawhney, y cols. (1966); pese a las distancias geográficas extremas de las cepas ensayadas por los primeros, contra las comparativamente cercanas de los segundos, quizás pueda explicarse considerando el origen migratorio común de los ovinos

ingleses, americanos y australianos. Debe considerarse además el hecho de que la seroneutralización puede revelar diferencias antigénicas sutiles, no detectables por la pruebas de protección cruzada.

Hussain y Burger (1989), estudiando propiedades biológicas, comparan diferentes aislamientos de ectima contagioso: por la morfología de las placas que producen, habilidad a inducir vesículas en piel y características en la curva de crecimiento in vivo, por muestreo secuencial de lesiones en piel producidas en cuatro borregos y una cabra. Al replicarse en células vero, los virus exhibieron similares parámetros de crecimiento, pero fueron distinguibles unos de otros en base a la morfología presentada en placas líticas en células, in vivo los períodos de latencia fueron de 48 hrs y estos virus variaron en su habilidad a inducir vesículas.

Incluso se ha sugerido la posibilidad de que en una misma costra procedente de un animal enfermo, puedan encontrarse dos cepas virales distintas en diferente proporción, (Robinson y cols. 1982). De confirmarse esta presunción, sería posible que el pasaje por cultivos celulares ejerciera un efecto selectivo sobre una cepa contra la otra, modificándose en esta forma las proporciones originales, sin que necesariamente se hubieran modificado las cualidades antigénicas del virus original.

Todo lo anterior sin embargo, obliga a suponer que el uso de técnicas, cada vez más sensibles, para detectar las variaciones entre muestras de un mismo virus, determine en un futuro inmediato el dejar de considerar a los virus como estructuras genéticamente estables, o por los menos, mucho menos estables de lo que se consideran actualmente.

#### 1.5. Relación entre Parapoxvirus.

La clasificación de los virus representantes dentro del género parapox, es materia de controversia. Nagington y cols. (1968), propuso una clasificación de acuerdo a la historia clínica y origen de la cepa ovina y bovina, incluso aislamiento de cepas humanas; lo cual fue muy cuestionable, por los reportes de infección cruzada y serología cruzada entre cepas de distinta procedencia.

Wittek en 1980, al estudiar diferentes cepas de estomatitis papular bovina y virus de ectima por análisis de DNA con endonucleasas de restricción, encontró gran heterogenicidad genética entre las cepas de ectima, sin embargo, encuentra que existe una gran relación entre los patrones de migración de algunos polipéptidos obtenidos, con cepas de ectima contagioso y dos cepas de estomatitis papular bovina.

También Raffi y col (1985), al estudiar el genoma de diez cepas de virus de parapox por inmunotransferencia con endonucleasas de restricción,

encontró gran heterogenicidad entre las diferentes cepas, sugiriendo que hay delección entre los segmentos de DNA y cambio de la secuencia de nucleótidos del DNA de los parapox.

#### I.6. Transmisión

La enfermedad producida por los parapoxvirus se presenta en animales jóvenes de dos semanas a dos años de edad (Jensen 1974, citado por Buddle y Pulford 1984).

Aynaud (1923) (citado por Boughton y Hardy 1934) es el primero que demuestra la gran resistencia del virus de ectima contagioso al medio ambiente y la abundancia del agente en las costras que se desprenden de los animales enfermos; en esto se apoya la hipótesis de que el virus es transmitido por contacto directo con animales enfermos, o con objetos contaminados (Robinson y cols. 1982).

Algunos autores han sugerido, la contaminación de los animales por la ingesta de forrajes toscos o malezas espinosas, sobre todo en época de secas, (Boughton y Hardy 1934; Fostel 1964 y Gardiner y cols 1967); herramientas, agua, camas, lana e instrumental de esquila (Boughton y Hardy 1934; Beck y Taylor 1974).

La transmisión experimental de Estomatitis Papular Bovina fue lograda mediante la introducción de virus en la mucosa oral por inyección o escarificación,



lográndose también por inoculación parenteral en terneros con material de lesiones ó con sobrenadante de cultivos de tejidos infectados y ocasionalmente con sangre de animales infectados ( Scott y cols. 1981). Además se produjeron las lesiones en una transmisión directa con material pasado por embrión de pollo y por contacto directo, colocando en un mismo corral un ternero sano con otro naturalmente infectado ( Armet 1988). Por otra parte, los intentos por reproducir la enfermedad del Ectima contagioso por inoculación subcutánea e intravenosa han sido inútiles ( Poulin y cols 1972, Wachendorfer y Valder 1980).

Estas situaciones, 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, (Boughton y Hardy, 1934 y Fostel, 1964). Bajo este mismo esquema de transmisión Gardiner y cols. (1967), explican la diseminación de la enfermedad al total de un rebaño en 5 días, proponiendo que los primeros animales se contaminan al ingerir la maleza espinosa (Templetonia retusa) e infectarse las heridas con el virus presente en el medio ambiente, luego el pastoreo con alta carga animal facilitó la transmisión entre

animales enfermos y sanos.

Se puede, pensar en otras vías de infección en el caso de ectima contagioso como: la respiratoria, tal como ocurre con viruela humana, ( Fenner y cols., 1974) y viruela ovina, ( Singh y cols., 1979), o incluso en la transmisión por insectos picadores que actúen como vectores mecánicos como ocurre en las viruelas aviáres, (Fenner y cols., 1974). Debe señalarse sin embargo, que los intentos por reproducir la enfermedad mediante inoculación subcutánea e intravenosa resultaron negativos, ( Poulin y cols., 1972 y Wachendorfer y Valder, 1980). Es de interés señalar, que si se ha podido transmitir la estomatitis papular bovina utilizando sangre de un animal infectado, (Ostertag y cols., 1940, citado por Aguilar -Setien, 1980a) Apoyando la posibilidad de infección directa de piel y por abrasiones con objetos contaminados y a partir de del medio ambiente.

### I.7 Patogenia:

Este aspecto tampoco ha sido estudiado convenientemente y la información disponible proviene, mayoritariamente de estudios clínicos con escasa inflamación de tipo experimental. Los virus de este género son altamente epiteliotropos y las lesiones se localizan mayoritariamente en piel y en casos menos frecuentes en mucosa digestiva superior o genital. (Tórtora J. 1985).

Sin embargo la presentación de la enfermedad puede que dependa de condiciones que determinen la depresión de la respuesta inmune del animal. En becerros la inducción de inmunosupresión con fines experimentales, coincidió con la observación de lesiones características de estomatitis papular bovina y el diagnóstico fue confirmado por microscopía electrónica, mediante la observación de las partículas virales características (Aguilar-Setién 1980).

También ha sido observada la presentación de la enfermedad por parapox, asociada a situaciones que pueden inducir o indicar la depresión de la respuesta inmune, como parasitosis. (Linnabary y cols. 1976) linfadenitis caseosa (Linnabary y 1976, Samuel y cols 1975 Okoh 1980), ó micosis (Morales y Van Kruninger 1971).

Sneider y cols (1982) reportaron una incidencia

umentada de estomatitis papular bovina en terneros neonatales inmunosuprimidos; además Obi y Gibbs (1978) al examinar las asociaciones entre ectima contagioso y la peste de los pequeños rumiantes, señalan que el ectima pudo utilizar las lesiones producidas por el virus de la peste como puerta de entrada y ser una consecuencia ó complicación secundaria; ó que el ectima contagioso se halla presentado como consecuencia de inmunosupresión inducida por el virus de la peste.

#### I.8. Lesiones:

Por su localización y aspecto, las lesiones producidas por parapoxvirus son lo suficientemente características, en los casos típicos, como para permitir un diagnóstico clínico con muy pocas probabilidades de error.

En el caso de EPB después de un período de incubación de 2,4 ó 7 días, se presenta eritema y pequeñas pápulas que van haciéndose rojo oscuras, se endurecen sobre la superficie y se expanden periféricamente, por lo que las lesiones son casi siempre redondas. A medida que la lesión se expande, la periferia se enrojece y el centro se hunde siendo de color café grisáceo y duro en la superficie. Cuando las lesiones se localizan fuera de la cavidad oral pueden cubrirse de tejido necrótico o de costras. (Snedler; y cols 1982).

Las lesiones individuales sanan rápidamente, algunas veces en solo 4 a 7 días, pero las marcas de las lesiones ya cicatrizadas, en forma de áreas circulares de mucosa rosada oscura, rodeada usualmente de una zona levantada y más pálida, que puede persistir durante varias semanas. En bocas muy pigmentadas es difícil ver hiperemia, aún en las fases agudas, pero se observan anillos grises decolorados periféricamente. Pueden presentarse series sucesivas de lesiones en un animal durante un período de varios meses, siendo frecuente que varias confluyan, se observan en labios, carrillos, ollares, encías, lengua y mucosa oral; en la necropsia es posible hallarlas en el esófago, rumen, retículo y omaso. (Rodríguez; y cols. 1988).

En el caso de ectima contagioso, las lesiones se desarrollan inicialmente como pápulas, luego pústulas que se cubren pronto por una costra gruesa que cubre una zona elevada de ulceración, granulación e inflamación. Las primeras lesiones se desarrollan en la unión oral mucocutánea, usualmente en las comisuras orales. De ahí se diseminan por el morro, ollares, y en menor grado, por la mucosa bucal. Estas lesiones pueden aparecer como costras gruesas, discretas y aisladas, o bien por confluencia constituir una placa aislada. En poco tiempo las lesiones se agrietan y las costras se vuelven dolorosas al tacto. Se desmoronan fácilmente pero son difíciles de desprender de la granulación

subyacente. Las lesiones pueden aparecer en el rodete coronario y las orejas, o bien alrededor del ano, la vulva, prepucio, o las mucosas nasal y oral. En los casos benignos las costras se secan y se caen completándose la recuperación en aproximadamente 3 semanas. Raramente se presenta invasión sistémica que se extiende por el tracto digestivo superior, o por la tráquea produciendo bronconeumonía. Los corderos afectados pueden sufrir un severo atraso en el desarrollo debido a la disminución de la alimentación. (Callis; y col 1982).

#### I.9.- Localización:

Las lesiones tienden a localizarse siempre en zonas de la piel con poca o ninguna presencia de lana o pelo. En los casos más frecuentes tienden a presentarse en los bordes mucocutáneos, especialmente en los labios y más particularmente en las comisuras labiales (Howarth, 1929; Boughton y Hardy, 1934; Gardiner y cols., 1967 Zebrowski y cols., 1974). Frecuentemente cubren toda la región perioral, extendiéndose hacia los hallares y pueden presentarse lesiones en los párpados y alrededor de los ojos e incluso en el interior de las orejas (Howarth, 1929 y Gardiner y cols., 1967), esta descripción corresponde a lo que se conoce como forma facial de los Parapox.

La forma podal de la enfermedad quizás sea más

frecuente de lo que se reporta, considerando que por su localización su observación no es tan sencilla como en los casos faciales (Robinson, 1983). El aspecto de este tipo de lesiones puede enmascarse por efectos mecánicos y sobre todo por las complicaciones bacterianas. La zona interdigital y el rodete coronario son el asiento más común de la lesión, que puede incluso llegar a afectar los cojinetes (Valder y cols., 1979).

La forma mamaria afecta la piel de los pezones y es frecuentemente su observación en hembras que amamantan corderos ó cabritos ó becerros con lesiones faciales u orales. Se ha sugerido que las crías transmitirían la enfermedad a las madres en el amamantamiento (Howarth 1929).

Una localización no siempre explorada es la presencia de lesiones en la mucosa digestiva, particularmente en boca: rodete dental, encías, paladar, dorso de la lengua; esta localización parece ser más frecuente en animales jóvenes (Howarth, 1929; Gardiner y cols. 1979). Se han descrito lesiones de ectima incluso en la mucosa ruminal (Morales y Kruiningen 1971).

Con menor frecuencia se ha comunicado la forma genital de la enfermedad, afectando labios vulvares, perineo, prepucio e incluso escroto, esta forma pese a su menor frecuencia fue descrita ya en las primeras

observaciones de la enfermedad ( Flook, y cols. 1903, citados por Hutyra y Marek, 1961). Se han comunicado casos espectaculares de lesión de escroto, con agrandamiento del mismo por acúmulo de líquidos hasta de 20 a 25 cm (Ohman, 1941).

Más raras son las lesiones en las axilas, cara interna del muslo, corvejones y base de la cola (Howarth, 1929).

Generalmente la enfermedad se presenta bajo alguna de estas formas clínicas y solo en casos excepcionales aparecen brotes o animales con combinaciones de más de una de estas formas de lesión. Sin embargo, existen comunicaciones de cuadros extendidos y sumamente graves como el descrito por Valder y cols. (1979) en Alemania. La enfermedad se presentó en corderos y adultos y a la forma podal y genital, se sumó la presencia de lesiones papilomatosas-proliferativas en la mucosa digestiva, con estomatitis, faringitis y esofagitis ulcerativa en otros animales, y con elevada mortalidad entre los corderos, muchos de ellos perdieron la pezuña. Un cuadro similar ha sido reportado por Okoh (1980), con lesiones múltiples y graves. También se han señalado casos en los que la enfermedad mantuvo su carácter agudo por los dos meses e involucró lesiones en el tracto gastrointestinal, pulmones y corazón, con una mortalidad del 18% ( Darbyshire, 1961, citado por Robinson y Balassu 1981).



En los rumiantes salvajes en los que se ha observado la enfermedad, la localización de las lesiones es semejante a las descritas para los domésticos. La mayor parte de las comunicaciones hace referencia a lesiones faciales y orales (Blood, 1971; Samuel y cols., 1975; Hebert y cols., 1977 y Kummenaje, 1979). En la comunicación referente a un caso en buey amizclero se describen lesiones en el tórax y perineo (Kummeneje y cols. 1979).

Recientemente se ha insistido en la presentación de formas sistémicas, altamente virulentas, particularmente afectando lotes de corderos en sistemas de cría artificial en Alemania ( Wachendorfer y Valder, 1980).

#### I.10. Respuesta Inmune en Parapoxvirus

En la enfermedad producida por los Parapox, señalan que los animales que enfermaban por ectima adquirían resistencia a la enfermedad por lo menos durante un período de 18 a 24 meses (Boughton y Hardy 1934), mientras que los animales recuperados de la infección por estomatitis papular bovina resistieron al desafío con otra cepa diferente del mismo virus (Moussa y cols. 1983).

En ectima contagioso los anticuerpos neutralizantes fueron detectados a los 24 días post-infección (PI); encontrando que los anticuerpos neutralizantes

eliminaron los virus infectantes de los sitios de inoculación ( Hussain y Burger 1989). Los anticuerpos neutralizantes han sido también comunicados en corderos amamantados por hembras considerada inmunes en cantidades que los autores señalan como protectores, por lo menos hasta tres semanas de vida (Poulain y cols. 1972). Se han demostrado niveles incluso mayores en el calostro que en suero, de anticuerpos precipitantes contra estomatitis papular bovina, en pruebas de inmunodifusión radial, pero este trabajo perseguía fines diagnósticos y la protección calostrual no fue evaluada (Aguilar-Setién 1980).

La presencia de anticuerpos neutralizantes ha sido demostrada mediante pruebas de titulación en microplaca de cultivos celulares tanto en sueros de animales enfermos y convalescientes (Poulin y cols. 1972), como en animales vacunados (Buddle y cols. 1984b). La actividad neutralizante parece encontrarse a los 15-30 días PI, para declinar a los dos meses, la mayor parte de esta actividad neutralizante dependerá de anticuerpos de tipo IgG, siendo muy pobre la actividad detectada de IgM, aún en casos de animales hiperinmunes (Poulin y cols 1972); Sin embargo la ausencia de protección calostrual en ectima contagioso también ha sido señalada por los 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).

La presencia de anticuerpos neutralizantes, en corderos amamantados por hembras consideradas inmunes en cantidades que los autores señalan como protectoras, por lo menos hasta las tres semanas de vida (Poulain y cols., 1972). La existencia de inmunidad calostrual también ha sido señalada en otro trabajo (Le Jan y cols. 1978). Pero sin embargo ninguna de estas comunicaciones, señala la realización de pruebas de desafío, que evaluaran críticamente el valor protector de estos anticuerpos, en los adultos o en los corderos presuntamente protegidos.

La presencia de anticuerpos en los animales naturalmente afectados o inoculados experimentalmente, fue demostrada originalmente con fines diagnósticos; Blakemore y cols en 1948, señaló la presencia de anticuerpos fijadores de complemento y aglutinantes, pero se falló en el intento de demostrar anticuerpos neutralizantes en dos muestras de origen humano.

Las primeras descripciones de la enfermedad señalan la observación, de que los animales que enfermaban de ectima adquirirían resistencia, por lo menos de 18-24 meses (Boughton y Hardy, 1934), mientras que en los animales "vacunados" la resistencia parecía ser menor, entre 6 y 12 meses, (Glover, 1928 citado por Boughton y Hardy, 1934). En un trabajo reciente, se observa una

más rápida curación en corderos previamente "vacunados" con virus mantenido en ovinos, que en aquellos animales "vacunados" con un virus previamente pasado por cultivos celulares y considerado de menor virulencia; lo que parecería confirmar la hipótesis de Glover ( 1932-33) en el sentido de que existiría una correlación positiva entre virulencia e inmunogenicidad (Buddle y cols., 1984b). Lamentablemente y pese al tiempo transcurrido desde las primeras observaciones, poco es lo que se ha avanzado en el conocimiento de los mecanismos inmunes de la enfermedad.

Hussain y Burger (1989); observan que el virus infectivo desaparece del compartimento vascular en cinco minutos y no desarrolla lesiones , sugiriendo que la diseminación de Parapox vía hematógica no es preferente y esta diseminación hematógica del virus de un sitio a otro puede no interferir con el ciclo de crecimiento del virus en piel.

La presencia de anticuerpos citotóxicos fueron detectados hasta un mes después de la infección experimental de borregos con E.C.; pero los anticuerpos citotóxicos no fueron detectados en animales infetados naturalmente (Koptopoulos y cols.1982). Además los anticuerpos circulantes a E.C. ocurrió más tarde en el curso de la enfermedad con niveles variables.(Robinson y Balassu 1981).

Al ser estimulados los linfocitos perifericos de borregos recuperados y controles no infectados con E.C.; la prueba de estimulación indica que los linfocitos de borrego expuestos a E.C, responden a la estimulación con el virus; siendo la respuesta específica, esto sugiere que la inmunidad mediada por celulas puede contribuir a la recuperación; además la existencia de otros factores inmunes pueden conferir resistencia a E.C. ( Hussain y Burger 1989).

Hussain y Burger (1989), no detectaron formación de interferón en suero y homogenados de piel, de ovejas y cabras infectadas experimentalmente, entre los 0 y 14 días posinfección. En este mismo trabajo, los anticuerpos neutralizantes pudieron detectarse hasta los 24 días posinfección y los autores consideran dado la respuesta de transformación blastoide linfocitaria; la eliminación del virus está relacionada con la respuesta inmune celular, que con mecanismos humorales y de interferón.

Buddle y Pulford (1984), al estudiar la inmunidad pasiva en corderos, se observa que esta no confiere protección al desafío con E.C. en corderos de un mes de edad, sugiriendo que la respuesta inmune predominante depende de una respuesta inmune mediada por células más que de una respuesta de tipo humoral.

Finalmente se ha señalado, la inducción de inmunidad de diferente duración en la resistencia a la enfermedad, según la zona de piel afectada. Las lesiones

faciales inducirían una inmunidad más duradera, que las de glándula mamaria, genital u otras. (Schmidt, 1967 y Kovalev y cols., 1971, citados por Robinson y Balassu, 1981).

#### I.11.- Diagnóstico

El diagnóstico de parapoxvirus, no ofrece mayores dificultades; el curso prolongado con signología leve, la edad en que los terneros (menores de 6 meses de edad), y los ovinos y caprinos (1 a 2 meses de edad se afectan más frecuentemente), el aspecto macroscópico y microscópico de las lesiones, y los aspectos epidemiológicos de estas enfermedades, permiten un diagnóstico clínico relativamente seguro. (Brugere-Picoux-J; Fedecta-M 1985).

Sin embargo cuando las lesiones no son las características y/o el cuadro epidemiológico no se presenta dentro de lo esperado (morbilidad y mortalidad), entonces el diagnóstico puede confundirse con: fiebre aftosa, rinotraqueitis infecciosa bovina, diarrea viral bovina, peste bovina, estomatitis vesicular, lengua azul, viruela ovina y caprina y las papilomatosis; ó con dermatitis producidas por piogenos especialmente Staphylococcus aureus.

Sin embargo en muchos de los casos antes mencionados, el cuadro clínico puede ser confuso o poco

preciso y en consecuencia, no es posible definir el diagnóstico del mismo, sin recurrir a pruebas diagnóstica complementarias que permitan confirmarlo. (Shelley-WB; y Shelley-ED;1983; Tórtora 1985). De estas, la observación en tinción negativa de macerados de tejidos afectados, en busca de las partículas virales características de los parapox, es la prueba más rápida y segura; sin restarle importancia a el diagnóstico por microscopia óptica, en el que a partir de una biopsia fijada con formalina y teñida con hematoxilina-eosina, se observa en la epidermis hiperqueratinización y parcialmente necrótica, en algunas áreas de células epiteliales aparecen vacuolizadas, en algunas áreas de células epiteliales aparecen vacuolizadas, en la dermis hubo células polimorfonucleares fibroblastos y células redondas con alguna dilatación de capilares.(Haxtel y cols 1975)

## 2. HIPOTESIS

Los virus de Estomatitis Papular Bovina, Pseudoviruela Bovina y Ectima Contagioso, son miembros del género parapoxvirus. La clasificación de este género es materia de controversia; ya que por pruebas de neutralización e inmunofluorescencia, no encuentran diferencia entre las distintas especies de parapoxvirus (Liebermann 1967; citado por Gassman y cols. 1984). Sin embargo se ha encontrado diferencias en el efecto citopático producido en cultivos celulares entre parapoxvirus bovino y ovinos, lo cual permite separar entre parapox bovino y ectima contagioso. Además se ha propuesto una clasificación acorde a la historia clínica manifestada por cada miembro del género parapoxvirus (Aynaud 1923, citado por Wittek 1980).

Recientemente la posibilidad de diferenciación con parapoxvirus por medios inmunológicos, usando sueros hiperinmunes ha sido demostrado (Rosebush 1982).

Además el análisis de DNA de parapoxvirus con endonucleasas de restricción (ECO R1 y HIND III), reveló gran heterogeneidad genética entre los aislamientos de virus de Estomatitis papular bovina, Pseudoviruela Bovina y Ectima Contagioso. (Rigby y cols 1977 citados por Gassmann 1984).

En este trabajo se intenta poner en evidencia que no existen diferencias antigénicas importantes, entre los distintos miembros del género parapoxvirus, empleando las técnicas de IDD, CIE, inmunomicroscopía electrónica e inmunotransferencia, para muestras de ectima contagioso, pseudoviruela bovina y estomatitis papular bovina.



## 2.1 OBJETIVO

En este trabajo se plantea como objetivo **primario** el siguiente:

Encontrar posibles relaciones entre cepas de **ectima contagiosa y parapoxvirus bovinos (Estomatitis papular bovina y Pseudoviruela bovina)**

Y como objetivo **secundario** se plantea el siguiente:

Mediante la aplicación de las técnicas de: **Doble difusión, contraelectroforesis, inmunomicroscopía electrónica, corridas electroforéticas e inmunotransferencia** encontrar relaciones antigénicas entre los parapoxvirus

### 3 MATERIAL Y METODOS

#### 3.1.1 Preparación de muestras de prueba y muestra de referencia:

Se obtuvieron muestras de costras de Ectima Contagioso(EC) de cabras y borregos de diferentes regiones del país, pero solo se contó para este estudio, con una muestra de Pseudoviruela y una de Estomatitis Papular Bovina (cuadro N.1). Las muestras se pesaron 0.3 gr de cada una de las 30 muestras, e incubaron 12 horas en solución amortiguadora de fosfatos (PBS pH=7.2), después se maceraron y conservaron a 4 C hasta el momento de su utilización.

Como muestra de referencia se utilizó un macerado de costras de origen caprino obtenido de un brote de Baja California Sur, previamente liofilizado y envasado en viales de 2 ml conservados entre 4 y 10 °C desde febrero de 1980. 15 viales de la muestra de referencia, se resuspendieron en un volumen total de 10 ml de medio para cultivo celular (MEM-EAGLE sin suero), y después se centrifugaron a 30 000 Xg (rotor SS-34 Sorval) y la pastilla obtenida fue usada en las diferentes pruebas.

En el cuadro N.1 se listan las muestras utilizadas en el presente estudio. Puede notarse se emplearon muestras de Ectima Contagioso ovinas y caprinas, muestras de Estomatitis Papular Bovina y Pseudoviruela Bovina, y una muestra de viruela aviar de paloma.

**CUADRO #1 ORIGEN DE LAS MUESTRAS DE  
PARAPOXIVIRUS UTILIZADAS EN  
EN ESTE ESTUDIO**

N Muestra	Origen	Especie	Localizacion y Características de la lesion	Fecha del Brote
EPB	C. Izcalli	Bovino	Mucico de becerro	Julio de 1985
PUB	C. Izcalli	Bovino	Piel del Pecho	Agosto de 1985
Referencia	B. California	Caprino	Costras en Labios y mucosa oral	Feb. de 1980
1	Teoloyuca	Ovino	Boca	Jul. de 1984
2	Almaraz	Cabra	Mamario	Marzo de 1988
3	Guanajuato	Cabra	Costras en Labios, prine y labios vulvares	Agosto de 1980
4	Tenopalco H. Ocampo	Ovino	Boca, Glandula mamaria	Dic. de 1985
5	Texcoco	Ovino Merino	Boca	Mayo de 1987
6	Mex. D.F.	Paloma	Viruela aviar	Agosto de 1987
7	Zumpango	Cabra	Costras Labiales	Julio de 1984
8	Acapulco	Cabra	Boca	Julio de 1987
9	Texcoco	Ovino	Boca y Glandula mamaria	Mayo de 1987
10	Almaraz	Caprino	Boca	agosto de 1985
11	C. Izcalli	Cabrillo	Escarificado II	
12	H. Ocampo	Ovino	Boca	Julio de 1984
13	Huehuetoca	Ovino	Boca (ulceras)	1982
14	V. de Ramos San Luis	Cabras	Boca	Puesto de 1935
15	Almaraz	Ovino	Boca	Abril-Mayo 1989
16	Celaya	Cabra	Boca Ubre	Dic-Ene de 1952
17	Rio Frio	Cordero	Boca	Junio de 1988
18	Tecamac	Cabra	Boca	1983
19		Cabritos	(Lesiones tetas IV)	1988***
20	Almaraz	Cabritos	Facial	Marzo de 1988***
21	3251	Cordero	Labio Ampolla lengua	
22	Tepec	Ovino	labios	Marzo de 1987
23	Acapulco	Chivos	Boca	Julio de 1988
24		Portadores I	Nasal y Perine	Marzo de 1988***
25	Puebla	Ovino	Boca	Mayo de 1989
26	Almaraz	Cabrillo	Boca	Marzo de 1988***
27		Cabra	Referencia (patron)	Febrero de 1980
28			Prjmarios III lesiones	Marzo de 1988***
29	R. G. Guadalupe	Cabra	Vulva	1988
30	R. G. Guadalupe	Cabra	Boca 308988	1988
31	Acapulco	Caprino	Labios	Julio de 1988
32	Swinus	Cabra		
33	Rio Frio	Ovino	Boca	1987
9213	Almaraz	Ovino	Paleta Espalda	1969
9187				
9189	Almaraz	Ovino	Boca	1989

\*\*\*MISMO BROTE

## 3.2 Obtención de Sueros Hiperinmunes

3.2.1. Animales. Se emplearon cuatro conejos Nueva Zelanda de aproximadamente tres kilos de peso.

3.2.2. Suspensión Viral: un vial de la muestra de referencia fue reconstituida con tres ml de medio para cultivo celular (MEM-EAGLE sin suero) y centrifugado a 1000 Xg durante 10 minutos, el sobrenadante fue utilizado para inmunizar a los conejos.

3.2.3. Calendario de Inmunización. Cada semana se inyectó por vía subcutánea 1.0 ml de la suspensión de virus durante un período de 10 semanas, el sangrado se efectuó una semana después de la aplicación del último estímulo.

### 3.2.4. Evolución y titulación del suero

El suero obtenido después del último estímulo fue titulado por las técnicas de IDD y CIE. Para ambas pruebas el antígeno usado, fue el mismo con el que se realizaron las inmunizaciones; Para IDD, el antígeno se colocó en la pozeta del centro y en las seis pozetas de alrededor se colocaron diluciones dobles del suero del conejo inmunizado.

Por CIE el antígeno se colocó en el cátodo y el suero de los conejos inmunizados en el ánodo; el antígeno se le hicieron diluciones dobles y cada dilución del antígeno fué enfrentado a todas las

diluciones dobles (1:0, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) del suero de los conejos inmunizados

### 3.3. Inmunomicroscopia Electrónica (IME)

En un tubo de ensaye se colocaron 0.2ml de suero antiectima y 0.2 ml de suspensión viral, y se incubaron durante 12 hrs a 4°C posteriormente se tomó una gota de la suspensión y se depositó sobre papel parafilm, sobre la gota se colocaron dos rejillas de 200 mesh, durante media hora, (las rejillas fueron previamente preparadas con membrana plástica de fomvar), se retiraron, se adsorbió el exceso de líquido con papel filtro y se tiñieron con ácido fosfotungstíco (solución al 2% a pH=7.2), durante 5 minutos. (Rosebusch y cols. 1983).

### 3.4 Contrinmunolectroforesis (CIE)

Se preparó una solución de agarosa al 1% en solución amortiguadora de barbituratos (pH=8.6) (apendice I) y se adicionaron 10 ml de esta solución a un portaplaca en donde se encontraban los portaobjetos previamente lavados y desengrasados, se dejó gelificar durante 5 minutos a temperatura ambiente; se hicieron horadaciones en paralelo con una distancia de 4 mm entre cada pozo. Los pozos se llenaron con antígeno o antisuero, colocando el portaplaca de tal manera que el anticuerpo quede situado en el ánodo y el antígeno en el cátodo; aplicando un voltaje de 0.065 amperes durante

90 minutos. (Chand y cols. 1985).

Se aplicaron dos lavados uno con solución amortiguadora de fosfatos (pH=8.6) (apendice I) durante 12 hrs y otro con agua destilada durante 24 hrs; y luego se tiñó con colorante negro de amido (apendice I) durante una hora a temperatura ambiente; y se destiñó enseguida con solución desteñidora (apendice I) hasta que se observaron las bandas de precipitación.

Con el fin de encontrar la mejor forma de presentación del antígeno soluble en la prueba de CIE; el antígeno se trató de tres formas: 1) la muestra de referencia liofilizada, resuspendida con medio de cultivo celular; 2) la muestra de referencia liofilizada y resuspendida con medio para cultivo celular, tratada con 2-mercaptoetanol y ebullición por un minuto; 3) la muestra de referencia liofilizada y resuspendida con medio para cultivo celular, se somete a calor (60 °C durante 12 hrs).

### 3.5. INMUNODIFUSION (IDD)

Se prepararon cajas de petri con 15 ml de solución de agarosa al 1% en amortiguador de barbituratos (pH=8.6), (apendice I) las placas se incubaron durante cinco minutos a temperatura ambiente y después a 4 °C hasta completar la gelificación, se hicieron las horadaciones con el horador de seis pozetas de 0.5mm

de diámetro y con una distancia de 3 mm entre el pozo central y cada uno de los laterales y se llenaron las pocetas colocando en el centro el suero positivo y en los pozos de alrededor las diferentes muestras de virus de ectima contagioso. (Morilla y cols. 1986).

Se dejaron en cámara húmeda a 4 °C de 12 hasta 48 horas. y posteriormente se aplicaron dos lavados uno con solución amortiguadora de fosfatos (PBS pH 8.6) durante 12 hrs. y otra con agua destilada durante 24 hrs. los geles se deshidrataron completamente a temperatura ambiente, y se tiñeron con solución de negro amido después se destiñeron con solución decolorante hasta la observación de líneas de precipitación.

### **3.6. Concentración de Proteínas virales**

Se realizó una precipitación con sulfato de amonio de acuerdo a la metodología descrita por Herber y cols 1972.

Las muestras problema y la muestra patrón fueron reconstituídas en 10 ml de medio para cultivos celulares (MEM-EAGLE sin suero) .

Se preparó una solución saturada de sulfato de amonio pH=5.8 disolviendo 55 gr del reactivo en 100 ml de agua destilada. La concentración final de la solución de sulfato de amonio(SA), se seleccionó con base a la especie de procedencia de las costras de la siguiente manera, al 35 % para las costras de borrego y 30 y 45%

para las costras de cabra; de acuerdo a la técnica descrita por Herbert y cols. 1972.

La precipitación se efectuó adicionando gota a gota la solución de SA, enseguida se centrifugó a 200Xg durante 15 minutos y se descartó el líquido sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 10 ml de agua destilada. El proceso se repitió dos veces más con las muestras de borrego, y en el caso de cabra se efectuó una precipitación con solución de SA. al 30% y una segunda con solución de SA al 45%.

El precipitado se resuspendió en 10 ml de agua destilada y se dializó contra solución salina (cloruro de sodio al 0.85%). El dializado se concentró por el método de deshidratación con azúcar glass. (Gassmann y cols. 1984).

### 3.6.2. Soluciones de Trabajo:

Se prepara una solución saturada de sulfato de amonio a pH=5.8 al 55%, y ese mismo momento se prepara la solución que se requiere, de acuerdo a la siguiente tabla:

Vol. de saturada Stock	Vol. de agua	% de Sol de trabajo	Mezcla de reacción de prot. % de saturación
10ml	0	100	50
9	1	90	45
8	2	80	40
7	3	70	35
6	4	60	30

### 3.7 Cuantificación de Proteínas



Para cuantificar las proteínas se utilizó el método de Bradford (1976), la curva patrón de albúmina sérica bovina (ABS) se preparó a partir de una solución al 1% de la cual se hicieron cinco diluciones logarítmicas. Posteriormente se agregaron por tubo 0.1ml de cada dilución de ABS, 0.1ml de cada muestra y 1 ml de reactivo de Bradford (100mg de azul brillante de Coomassie G-250, disuelto en 30 ml de etanol al 95% y 100ml de ácido fosfórico al 85% y agua destilada c.b.p. 1000ml). y para el blanco se tomó 0.1 ml de agua destilada más 1 ml de reactivo de Bradford; se mezclaron los tubos y se leyeron en un tiempo máximo de una hora a 595 nm, en un espectrofotómetro (Espectronic 88 Bausch & Lomb).

### 3.2. Adsorción de Sueros

Se utilizaron 0.3gr de costra producto de un traumatismo y negativa a EC., se incubaron durante 12 hrs a 4°C, y después se maceraron en solución salina estéril y ajustada a una absorbancia de dos a una longitud de onda de 600 nm. La suspensión de costra negativa a EC., se mezcló con volúmenes iguales de suero positivo a E.C., se incubó durante dos horas a temperatura ambiente y 12 horas a 4 grados centígrados; con la finalidad de eliminar respuestas inespecíficas a proteínas presentes en las costras; los complejos antígeno-anticuerpo fueron eliminados por centrifugación

a 300 Xg; durante 30 minutos.

### 3.10. Aislamiento de Bacterias

Las muestras de referencia fueron resuspendidas con 3 ml de medio para cultivo celular, y se sembró en agar soya tripticasa; una vez crecidas las diferentes colonias fueron purificadas seleccionando las colonias y sembrándolas en otra caja de agar soya tripticasa y una vez purificadas se les realizaron las siguientes pruebas bioquímicas para la identificación del género: Gram, catalasa, OF, movilidad, crecimiento aerobio y anaerobio, oxidación de la glucosa.

Al encontrar el género a que pertenecen las bacterias contaminantes, se procedió a la identificación de la especie mediante las siguientes pruebas bioquímicas: reducción de nitratos, indol en TSI, ureasa, utilización de citratos, y reducción de los azúcares xilosa, glucosa y manitol. (cuadro #1A)

### 3.11. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodesilsulfato de sodio (SDS-PAGE).

3.11.1. Preparación de muestras: Las muestras fueron preparadas de acuerdo con el punto 2.1. y a cada muestra se le determinó la cantidad de proteína presente, los ml de solución de muestra utilizados se determinaron de

acuerdo con la concentración de proteína, y ajustados a una concentración de 150ul; se adicionó la misma cantidad de solución amortiguadora para tratamiento de muestra, colocándose en baño maría durante un minuto.

### 3.1.2. Preparación de los Geles:

El corrimiento electroforético se efectuó de acuerdo al método de geles discontinuos descrito por Laemli en 1970.

Se utilizó acrilamida al 15% para el gel concentrador y acrilamida al 10% para el gel separador; el voltaje empleado para el corrimiento fue de 100 volts una vez que las muestras llegaron hasta el gel separador y de 150 volts para el gel concentrador. Los geles fueron preparados de acuerdo a las siguientes formulaciones :

	Separador	Concentrador
	10%	
Acrilamida	10 ml	1.3 ml
Buffer 8.8	7.5ml	--
Buffer 6.8	--	2.5ml
SDS	0.3ml	0.1ml
Agua	12.05ml	6.1ml
Persulfato de amonio	150ul	50 ul
Temed	15ul	5ul

Después del corrimiento electroforético el gel fué teñido durante dos horas, se eliminó el exceso de colorante, una vez transcurrido este tiempo; e inmediatamente se destinó; primero con solución desteñidora I, durante 2-4 horas; y después con solución desteñidora II hasta la completa decoloración del gel.

### 3.12. INMUNOTRASFERENCIA

#### 3.12.1. preparación de muestras:

Se emplearon las proteínas virales concentradas, como se describe en el punto 3.6.

#### 3.12.2. Método

Las proteínas de las muestras separadas por corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida se transfirieron a papel de nitrocelulosa por la técnica descrita por Bowen (1980). De acuerdo a este método, el a el siguiente diagrama:

Acrílico	+++++
Scotch	=====
Papel filtro	+++++
Gel	=====
Papel de Nitrocelulosa	-----
Papel filtro	+++++
Scotch	=====
Acrílico	+++++

El paquete así formado se sumergió en amortiguador de fosfatos (PBS pH=7.4) y se incubó durante 48 hrs.

Después de este período el gel fué teñido con azul de Coomassie para comprobar la transferencia de las proteínas.

Se utilizó la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) para revelar la reacción antígeno-anticuerpo, entre el suero de los conejos inmunizados con la cepa patrón y las diferentes bandas proteicas procedentes de diferentes muestras transferidas a la nitrocelulosa.

Se empleó el suero de conejo antiectima ajustado a un título de 1:8 por las técnicas de CIE y DDF. El suero y el papel de nitrocelulosa se dejaron en contacto durante dos horas a temperatura ambiente, el sobrenadante se eliminó totalmente y se lavó tres veces con solución de PBS. Se adicionó el conjugado anticonejo-peroxidado (sigma con título 1:300), y se incubó durante dos horas, nuevamente se lavó tres veces con solución de PBS pH=7.4 y posteriormente se reveló con solución reveladora hasta la aparición de líneas coloreadas en la nitrocelulosa.

#### 4. RESULTADOS:

##### 4.1 Obtención de Sueros Hiperinmunes

Los conejos no manifestaron ninguna reacción alérgica a pesar de que el período de inmunización fué muy largo (10 semanas). A las 5 semanas de inoculación, no se obtuvieron líneas de precipitación en la prueba de CIE y IDD, por lo que se decidió seguir el programa de inmunización por un período de 5 semanas más, al final de las cuales, se obtuvo un título de 1:32 por las pruebas antes mencionadas. (figura N 1).

##### 4.2. Reacciones de Idéntidad de Ectima contagioso por Pruebas de Doble Difusión y Contrainmunolectroforesis

Por las pruebas de doble difusión (IDD) y contrainmunolectroforesis (CIE) se obtuvieron de una hasta tres líneas de precipitación con los diferentes muestras de parapoxvirus, y algunas muestras resultaron negativas, (Cuadro N. 3, figura N. 1 y 2).

Las pruebas de tratamiento de las muestras con: 1) muestra de referencia resuspendida con medio de cultivo celular; 2) La muestra de referencia resuspendida con medio de cultivo celular y tratada con 2-mercaptoetanol

y ebullición por un minuto; 3) La muestra de referencia resuspendida con medio de cultivo celular y sometida a calor (60 °C durante 12 hrs); determinaron resultados muy similares para los tres tratamientos, por lo que se optó por usar el sistema N.1.

Se aislaron las bacterias de Bacillus. polimixa y Bacillus megaterium, que se aislaron como contaminantes de la muestra liofilizada empleada como referencia, por esta razón fueron evaluadas como antígenos en la prueba de inmunodoble difusión a los efectos de establecer un control en la respuesta del conejo inoculado. En ambos casos resultados negativos, es decir no se observaron bandas de precipitación, (figura #2b), por lo que se descartó la formación de anticuerpos precipitantes en el suero.

Las líneas de precipitación que se obtuvieron con muestras de parapox bovino (estomatitis papular bovina EPB y pseudoviruela PVB) indicaron: una línea de identidad en la muestra de referencia y PVB, una línea de identidad en la muestra de referencia y EPB, que se extendió con la muestra 2 y PVB además de manifestar otra línea de identidad en las muestras EPB y PVB (figura N. 2A).

No se obtuvieron bandas de precipitación con las muestras 18, 20, 21, 22, 25 y 29 con ninguna de estas dos técnicas; mientras que la muestra 11 no mostró bandas por CIE pero por DDF si y la muestra 7 no dió por

DDFpero por CIE dió resultados positivos. (cuadros N.3 y N.4). La muestra de viruela aviar (#6) resultó negativa en ambas pruebas.

#### 4.4. Inmunomicroscopía Electrónica

Por la técnica de inmunomicroscopía electrónica, se encontró que las muestras presentan formas C o tipo 2, y formas M o tipo 1; (cuadro N.6).

Las partículas virales de E.C. predominantes son de tipo 2 o formas C; con la excepción de la muestra 20, que presenta solo la forma tipo C sin corola, todas las demás presentaron las cuatro formas virales: tipo M con corola y sin corola; tipo C virus con corola y virus sin corola; (foto N 1 y 2), y cinco cepas (10, 12, 17, 18, y 26) que solo manifestaron estructuras con corola dentro del tipo C y M. (cuadro #5).

Los virus de Parapoxvirus (PVB, EPB), presentaron predominantemente partículas tipo 2, aunque también se observaron partículas tipo 1; y en la prueba de inmunomicroscopía electrónica fueron observadas las dos formas: virus con corola y virus sin corola; aún dentro de la misma muestra de virus, en el mismo campo de observación del microscopio electrónico de transmisión (foto N.3).

Es necesario notar que con microscopia electrónica es imposible diferenciar entre virus de ectima



contagioso, pseudoviruela bovina y estomatitis papular bovina; debido a que los parapoxvirus presentan la misma forma estructural. (Rosebush 1982)

#### 4.5. Patrones Electroforéticos

Se ensayaron tres concentraciones de geles de poliacrilamida: 7.5%, 10%, 15%. En la concentración de 10% el patrón electroforético se observó con mayor definición.

En los corrimientos iniciales se apreciaron bandas de precipitación desde los 65 kd hasta 55 kd, (cuadro N.7), que coincide con la banda de albumina; por esto se decidió precipitar las muestras con sulfato de amonio, y de este modo intentar eliminar albúmina presente en las muestras. (figura N.4 cuadro N.7).

Primero se realizó un corrimiento electroforético utilizando dos muestras de ectima contagioso (EC), la muestra de referencia, una muestra de EPB, y como controles: 1) suero de cabra, 2) costra traumática de cabra y 3) una mezcla de B. megaterium y B. polymixa 4) calostro de cabra. Se encontró que las muestras compartían algunas proteínas con los controles, (mezcla de bacterias (B. polymixa y B. megaterium), costra traumática, y suero de cabra); y que las muestras de ectima contagioso presentaban una proteína común de 55 KD. con el virus de EPB. (Figura N.4).

Posteriormente se efectuó otra electroforesis con las siguientes muestras de EC:9 de cabra: UC, PP, 3, 14, 16, 19, 20, 24, 26 y 5 de ovino: 17, 15, 22, 9213 y 9107+9109 y las dos bovinas (una de EPB y una de PVB). En esta segunda corrida se observó la precipitación de dos proteínas comunes al género de parapoxvirus, una de 55Kd y otra de 9.5Kd. Como se puede ver en los cuadros #8 algunas proteínas son más frecuentes que otras, también se observa que hay una mayor heterogeneidad proteica en la región de 44 Kd a 30 Kd. Las proteínas más frecuentes son: una de 17 Kd, presente en 12 muestras, y otra de 35 Kd presente en 10 muestras. Las menos frecuentes son proteínas que se encuentran dentro el rango de mayor heterogeneidad de peso molecular. (cuadro N. 8 figura N. 5)

Comparando el patrón electroforético de la muestra de referencia con el de otras muestras de ectima, se encontraron 6 proteínas de las cuales dos son comunes al género parapoxviridae una de 55Kd y otra de 9.5Kd; la proteína de 48 Kd comparte con solo 3 muestras y la proteína de 44 Kd con 5 de las muestras.

La muestra de referencia centrifugada presentó las mismas bandas además de otras; la muestra 22 presentó las mismas bandas que la de referencia excepto la de 17 Kd. Por otro lado la proteína de 48 Kd y la de 45 Kd. la comparte con cinco muestras, la de 35 Kd. con

9 muestras y la de 17 Kd con 11 muestras. (cuadro N. 8, figura N.5).

Tratando de entender mejor la epidemiología de los brotes de E.C. fueron formados los cuadros N:10, N:11, y N:12, de los diferentes patrones electroforético manifestados en las distintas muestras de ectima contagioso en base a: lugar de origen de las muestras, fecha del brote, especie que afectó el brote. sin encontrar alguna relación ó diferencias significativas entre estos grupos.

#### 4.6. Inmunotransferencia

Por la técnica de inmunotransferencia se observó que las proteínas que fueron reconocidas por el antisuero de conejos, preparado con la copa de referencia, se encontró entre los pesos moleculares de 55 Kd y 35 Kd, en las diferentes muestras de parapoxvirus estudiados.

Se observó una proteína común que fué reconocida en todas las muestras y tuvo un peso molecular de 55 KD y al parecer esta formada por dos proteínas una de 55 Kd y otra de 54 Kd. También se encontró que los antisueros identifican la banda de 37 KD compartida por la muestra de referencia y las muestras PP, N 7, N 16 y Pseudoviruela ; otra proteína que se encontró presente en varias muestras (PP. PVB, N 3,) tuvo un peso molecular de 45.7 Kd; otra proteína de 45Kd fué

reconocida en las cepas N.13, N.16, N.3; y la de 41 Kd que se manifiesta en las cepas UC, PP, N.7. (Cuadro N. 12 , figura N.6).

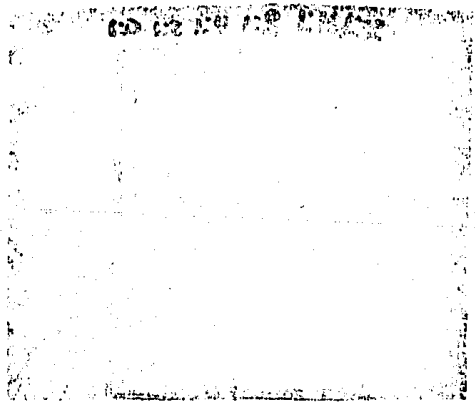
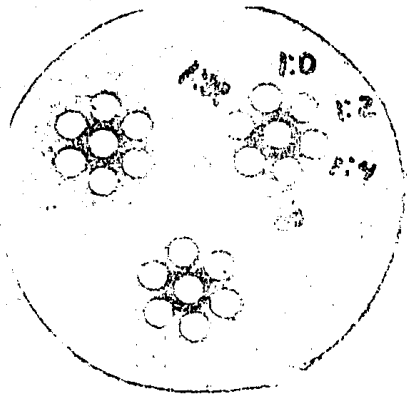
**CUADRONIA.** Pruebas bioquímicas de identificación  
de las bacterias contaminantes en Costras de Parapox.

OF	Fermentativo	
Catalasa	Positivo	
Glucosa	Positivo	Genero
Movilidad	Positivo	Bacillus.
<b>Bacillus</b>	<b>Megaterium</b>	<b>Polymyxa</b>
Cres. Anaerobico	Negativo	Positivo
Citratos	Positivo	Negativo
Nitratos	Positivo	Positivo
Urea	debil	Negativo
UP	Positivo	Positivo
Reduccion de		
Xilosa	Positivo	Positivo
Glucosa	Positivo	Positivo
Indol	Negativo	Positivo

**FOTO # 1**

**FOTO 1A:** El suero de conejo titulado por la técnica de IDD. En el centro se adicionó el antígeno (virus de ectima contagioso, de referencia) y alrededor diluciones del suero antiectima preparado en conejo.

**foto 1B:** El suero de conejo fue titulado la técnica de CIE, enfrentando la muestra de referencia a diferentes diluciones del suero antiectima, preparado en conejo



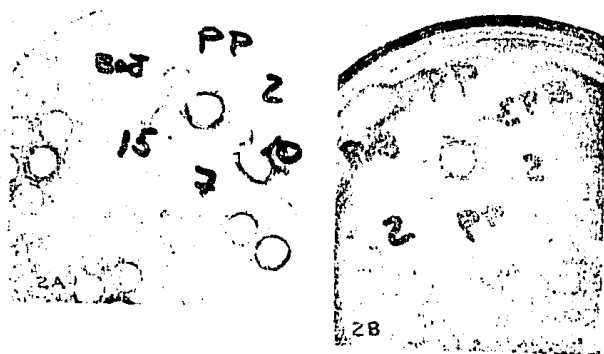


FOTO 2

FOTO 2A: Diferentes muestras de EC. y las bacterias contaminantes fueron enfrentados a una dilución de 1:16 de suero antiectima colocado en el centro.

FOTO 2B: Al enfrentar el antisuero antiectima con Pseudoviruela bovina y Estomatitis paoular bovina, y las muestras de ectima contagioso, (muestra de referencia y muestra dos)



**Cuadro #2 Resultados de la prueba de doble difusión con suero de conejos inmunizados con la muestra de referencia.**

# de Bandas	Total de Muestras	Muestras			
		Ovino	Caprino	Bovino	Aviar
0	8	3	4	0	1
1	20	5	15	0	0
2	7	4	1	2	0
tot.de muestras		12	20	2	1

**CUADRO 3**

Relación de las muestras con diferente  
número de bandas de identidad  
por IDD

No. de Bandas	No. de Muestras	Clave de las Muestras
0	8	6, 7, 18, 20, 21, 22, 25, 29
1	20	1, 2, 3, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 19, 23, 24, 26, 27, 28, 30 31.
2 o mas	7	PP, 4, 15, cc, 13, PUB, EPB

**CUADRO#4** Resultados de la prueba de contrainmunolectroforesis con suero de conejos inmunizados con la muestra de referencia.

#de Bandas	Tot.de Muest. Positivas	MUESTRAS			
		OVINO	CAPRINO	BOVINO	AVIAR
0	12	4	5	2	1
1	17	4	13	0	0
2/3	5	2	3	0	0
TOT.de Muestras		10	21	2	1

**FOTO 3:**

Por la técnica de inmunomicroscopía electrónica, observamos partículas con corola (3a), y partículas sin corola (3b)

CUADROHS Formas de Parapoxivirus presentes en las muestras estudiadas, por Inmunomicroscopía Electrónica.

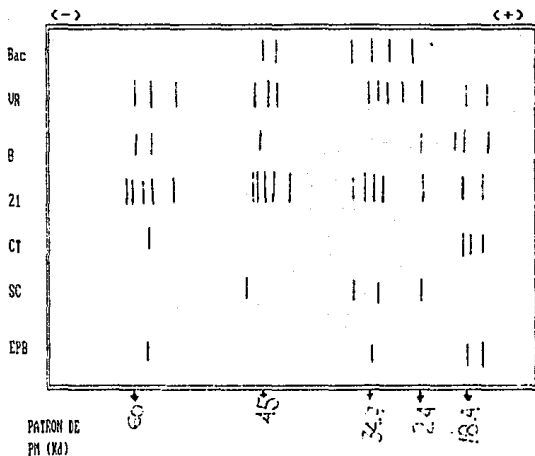
Virus M		Virus C	
Corola	S/Corola	Corola	S/Corola
1,4,5,6, 8,11,17, 19,PUB, UC, PP.	1,4,6,8, 11,19,EPB PUB,UC.	1,2,3,7,9, 10,12,13, 14,15,16, 18,19,21, 22,23,24, 25,26,27, 28,29,30, 31, PUB, EPB,UC.	1,2,3,7,9, 13,14,15,16, 19,20,21,22, 23,24,25,27, 28,29,30,31, EPB, PUB,UC,PP.

Cuadro No. 6 Número de formas de parax por IME.

# de Formas: Tipo I(c/c y s/c) Tipo II(c/c y s/c)	Total de Muestras	Muestras		
		OVINO	CAPRINO	BOVINO
4 FORMAS	6	0	4	2
3 FORMAS	0	0	0	0
2 FORMAS	22	8	14	0
1 FORMA	6	3	3	0
TOT. DE MUESTRAS		11	21	2

s/c= sin corola c/c= con corola

Figura #1 PATRON ELECTROFORETICO  
DE VIRUS DE ECTIMA CONTAGIOSO



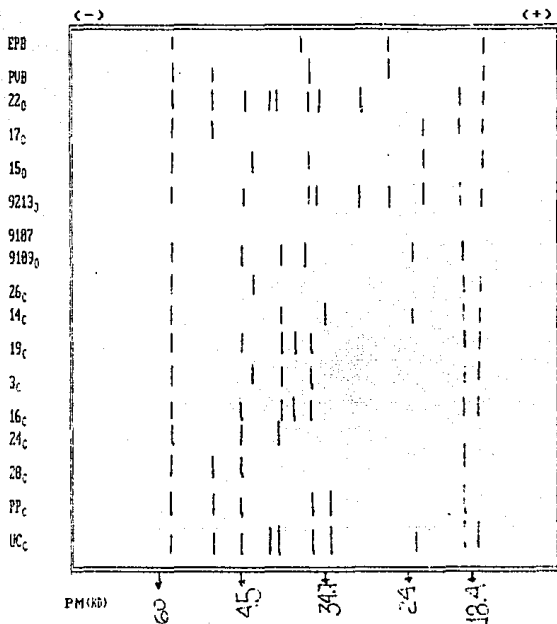
EC=Suero de cabra  
 EPB= Virus de estomatitis papular bovina  
 UR= Virus de referencia de ectima contagioso reconstituido  
 CT= Costra traumática de cabra  
 Bac= Bacterias contaminantes de las muestras de costrar (*B. polymyxa* y *B. megaterium*)  
 B= Colostro de cabra  
 EIC= muestra positiva a ectima contagioso

CUADRO No. 7 Patrones Electroforéticos Presentes  
en las muestras de Parapoxvirus.

Virus de Referencia	Calostro	Costra Traumática	Suero de Cabra	Bacterias	Virus EPB	Muestra 21	
						64.5	(-)
62.9	62.9					62.9	
55	55	55			55	55	
						53	
58.6						58.6	
48			48			48	
				47		47	
45	45					45	
				44		44	
42			42			42	
				35			
35				31		34	
30			30	28		30	
						29	
25					33	25	
21	21			20		21	
	19	18	19				
17	17	17			17	17	
9.5	9.5	11			9.5	9.5	(+)



Figura # 2 ELECTROFORESIS DE MUESTRAS DE PARAPOXIVIRUS



EPB= Virus de estomatitis papular bovina

PP= Virus de referencia de ectima contagioso reconstituido

PUB= VIRUS DE PSEUDOVIRUELA BOVINA

UC= Virus de Referencia de Ectima Contagioso, concentrado por centrifugación

o=muestras de ectima contagioso de origen ovino

c= muestras de ectima contagioso de origen caprino

b= muestras de parapoxivirus de origen bovino.

**Cuadro# 10 Patrones Electroforéticos de 14 Muestras de E.C. y una muestra de EPB y una de PUB.**

PUB <sub>0</sub>	EPB <sub>2</sub>	22 <sub>0</sub>	17 <sub>0</sub>	15 <sub>0</sub>	9213 <sub>0</sub>	9187 <sub>0</sub>	26 <sub>c</sub>	14 <sub>c</sub>	19 <sub>c</sub>	3 <sub>c</sub>	16 <sub>c</sub>	PP <sub>c</sub>	UC <sub>c</sub>	24 <sub>c</sub>	28 <sub>c</sub>	
55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55
49		40	46										48	48		48
		45				45			45		45	45	45	45	45	45
				42			42			42						
									39							39
		38			30	35		38							38	38
		37		35	35			31	35	35	35	35	35	35	35	35
38	33	35		25	34	27			25	25	25	31	31	31		
		31			25	21										22
		21			21	21										
17	17		17	17	17			17	17	17	17	17	17	17	17	17
		15	15	15	15		15								15	
9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5		9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5			

t= Muestras de Origen Bovino  
o= Muestras de Origen Ovíno  
c= Muestras de Origen Caprino  
PUB= Pseudovirus bovina

EPB= Estomatitis papular bovina

PF= Virus de referencia de ectima contagioso precipitado con  $(NH_4)_2SO_4$

UC= virus de referencia de ectima contagioso concentrado por centrifugación

**Cuadro 11 Pesos Moleculares de las  
Proteínas de Muestras de EC.  
en base a especie afectada.**

OVINO			CABRITO		OVEJA	CABRA		(-)
22	15	13	26	20	17	3	UC	
55	55	55	55	55	55	55	55	
47.5							47.5	
45				45			45	
38			42		42	42		
37							39	
35	35	35	35				38	
31							35	
				31			31	
	25		24.5				24.5	
21			21				22	
	17	17		17	17	17	17	
15			15				15	
9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	

UC= Virus de referencia concentrado por centrifugación

EC= Virus de ectima contagioso.

Cuadro 12 Pesos Moleculares de las Proteínas de las muestras de E.C. Agrupadas en base a Fecha del Brote.										
AÑO	1968	1969	1982	1982	1985	1987	1988	1988	1989	(-)
UC	3	16	13	14	22	17	20	15		
55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	
47.5										
45		45					45	45		
39	42		42		42					
38				38						
35	35	35	35		35				35	
31				31				31		
	25	25	25		25	25			25	
22		22			22					
17	17	17	17	17		17	17	17	17	
15	15				15					
9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	(+)

UC=Virus de referencia de ectima contagioso concentrado por centrifugación

Cuadro#13 Pesos Moleculares de las Muestras de E.C. en base a el lugar de origen.

UC	16	22	20	3	14	17
55	55	55	55	55	55	55
47.5		47.5				
45	45	45	45		42	43
39				42		
38	38	38			38	
35	35	37		35		
		35				
38.5		31	31		31	31
22	25	21		25		25
						28
17	17		17	17	17	17
15		15		15		15
9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5

(-)

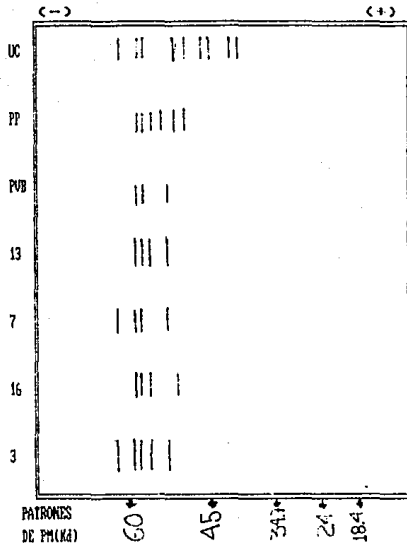
(+)

UC-Baja California  
16- Celaya  
22- Tepic

20-Rimmar C-1  
3 -Guanajuato  
14-San Luis Potosi

17- Rio Frio.

FIGURA # 3  
 PATRONES ELECTROFORETICOS  
 DE INMUNOBLOTTING



UC= virus de referencia del virus de ectima contagioso concentrado por centrifugación  
 PP= Virus de referencia de ectima contagioso, tratado con  $(NH_4)_2SO_4$   
 PUB= Virus de Pseudoviruuela bovina  
 13, 7, 16, 3= muestras de ectima contagioso tratadas con  $(NH_4)_2SO_4$

CARBONIA Proteínas que reconoció el suero inmune de conejo preparado con la muestra de referencia, en las muestras de parapoxivirus						
UC	PVB	FP	13	7	16	3
63				63		63
55	55	55	55	55	55	55
54	54	54	54	54	54	54
		53				
	50	51	51		51	51
48		48	48	48		48
45		45			45	
39						
36						
30						
25						

(-)

(+)

Virus de referencia concentrado por centrifugación

Virus de Pseudotularemia bovina

Virus de referencia tratado con  $(NH_4)_2SO_4$

13, 7, 16, 3 = Muestras de ecdosis controladas tratadas con  $(NH_4)_2SO_4$

**Cuadro# 15 Frecuencia de las proteínas presentes en los patrones electroforéticos de las diferentes Muestras de parapox.**

PH	# de Muestras OVINO	# de Muestras CAPRINO	# de Muestras BOVINO	# de Muestras Negativas
55	5	9	2	0
40	4	3	1	0
45	2	6	0	0
42	1	2	0	13
39	0	2	0	14
33	2	3	0	11
37	1	0	0	15
35	3	6	0	7
31	2	4	1	9
25	2	4	0	10
21	3	2	0	11
17	3	7	2	4
15	4	3	0	9
9.5	4	7	2	3



## APENDICE I

### 2.5.2. Soluciones:

#### Amortiguador de Veronal (Barbituratos)

Acido 5,5 dietilbarbitúrico ( $C_8H_{11}N_2O_3$ )	1.66gr
5,5, Dietilbarbiturato sodico ( $C_8H_{11}N_2$ ) <sub>3</sub> Na	12.76gr
Agua Destilada	1000ml

Solución Colorante de Negro Amido

Negro Amido (Naftaleno)	100gr
Metanol	500ml
Acido Acético Glacial	100ml
Agua	Aforar a un litro.

Guardar en frasco ambar.

#### Solución Decolorante de geles

Metanol	500 ml
Acido Acético Glacial	100ml
Agua Destilada	400ml

(Guardar en frasco ambar).

## APENDICE II

### 2.8.3. Soluciones

- 1.- Solución Stock
  - Acrilamida 58.4 gr
  - Bisacrilamida 1.6 gr
  - Agua 200ml
  - guardar a 4 °C
- 2.- Amortiguador de Corrida 4X ( 1.5 M tris-Cl pH=8.8)
  - Tris 36.3 gr ajustar a pH=8.8 con Hcl.
  - ; Agua 200ml
- 3.- Amortiguador de Separación ( 4X 0.5 M Tris-cl PH=6.8)
  - Tris 30 gr ajustado a pH=6.8 con Hcl.
  - Agua 50 ml
- 4.- Iniciador (Persulfato de Amonio 10%)
  - persulfato de Amonio 0.5gr
  - Agua 5 gr
- 5.- Amortiguador de corrida (0.375M Tris-Cl pH= 8.8 1% de SDS)
  - Tris 25 ml sol (2)
  
  - SDS 1 ml de (4)
- 6.- 10 % SDS
  - SDS 10gr
  - agua 100ml
- 7.- Amortiguador de tratamiento 2X( 0.125 M tris- Hcl pH= 6.8; 4%SDS)
  - Tris 25 ml de sol. #3
  - SDS 4ml de sol. 6
  - Glicerol 2 ml
  - 2- mercaptoetanol 1 ml
  - Agua 1 ml
  - Se divide en alicuotas y congela
- 8.- Amortiguador de tanque ( 0.025 M Tris pH= 8.3, 0.192M Glicina 0.1% SDS)
  - Tris 12gr
  - Glicina 57.6gr
  - SDS 40 ml de sol. 6

9.- Solución de Tinción ( 0.125% de azul de coomasie R-250)

Azul de Coomassie R-250	62.5ml de sol. 9
Metanol	250 ml
Acido Acético	50 ml
Agua	500ml

11.- Solución desteñidora I ( 50% Metanol, 10% acido acético)

Metanol	500ml	
Acido Acético	50 ml	
Agua		1 litro

12.- Solución desteñidora II (7% acido acetico, 5% metanol)

Acido Acético	700ml
Metanol	500ml

## APENDICE III

### 210.3. Soluciones:

#### 1.- Amortiguador de Fosfatos (pH=7.4)

Solución X= Na H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 0.2M

Solución Y= Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 0.2M

Solución de Trabajo:

80 ml de solución X más 420 ml de solución Y, ésta mezcla se

afora a 4 lt. y ajusta a pH=7.4.

#### 2.- Solución Bloqueadora

Solución Stock 10X Tris-Salina pH=7.4

12.1 gr/lt Tris 0.1M

87.7 gr/lt NaCl 1.5M

Solución de Trabajo:

10 ml de solución Stock

90 ml de agua destilada

0.05% de Tween 20.

#### 3.- Solución Reveladora

Alfa cloronaftol 30 mg

Metanol 10 ml

PBS 50 ml

Agua Oxigenada 50 ul

Estos reactivos son adicionados en dicho orden, y hasta el momento de usarse se agrega el agua oxigenada .

## DISCUSION

Fese a que en este estudio se trabajó con muestras que se colectaron entre los años de 1983 a 1989; este aspecto no parece haber afectado los resultados y confirma resultados anteriores respecto a la resistencia de estos virus.(Raffi y col.1985).

El suero inmune preparado en conejo, alcanzó en IDD un título de 1:32. Con IDD se obtuvo mayor cantidad de muestras positivas que por CIE;(cuadro N: 2 y 4). Este diferente comportamiento de las muestras, al ser evaluados con el mismo suero, en las técnicas de IDD y CIE resulta curioso considerando que se trata básicamente del mismo procedimiento diagnóstico. Es posible dada la diferenciade sensibilidad de las técnicas, influenciado por la concentración de antígeno en las muestras y la de anticuerpos en el suero; determinado para CIE zonas de equivalencia fuera de los valores estandarizados para IDD, con la consecuente ausencia de líneas de precipitación. Estas técnicas confirmaron su valor como alternativas de diagnóstico para la demostación de antígenos virales en las muestras ensayadas ( Sawhney y cols.1973; Puran Chand y cols. 1985; Tórtora y García 1987).

Se puede asumir que un antisuero antiictima, la mayoría de los anticuerpos de la respuesta son dirigidos principalmente contra los antígenos de superficie de la cubierta del virus, (Buddle y cols. 1984) al realizar

corrimientos electroforéticos de 11 muestras de ectima contagioso, sugieren que entre los polipéptidos localizados en los pesos moleculares de 37Kd a 44Kd se localizan los componentes de superficie, considerando su mayor heterogeneidad, y estos tendrían importancia en la respuesta inmunológica del huésped.

Sawhney y col. (1973), encuentran con la técnica de IDD, que las distintas muestras de EC, algunas presentan hasta tres líneas de precipitación y otras solo una, y esto, relacionado a la cepa con que se preparó el antisuero en conejo, que reconoce de una hasta tres precipitinas diferentes. Tórtora y García (1987), obtienen al IDD una sola línea de precipitación. Al ensayar diversas muestras de EC, en este estudio se obtuvieron muestras con ninguna, una y hasta tres líneas de precipitación con el mismo suero hiperinmune (PP, 2,5,7,13), y no solo con la cepa de referencia, con la que se preparó el suero. (cuadro N 3).

Los resultados con la técnica de IDD se pueden considerar específicos dado que las bacterias contaminantes de las costras (B. polymyxa y B. megaterium); no dieron líneas de precipitación; lo que indica que el suero inmune de conejo no presenta anticuerpos específicos contra ninguna de estas bacterias o su concentración no interfiere con la técnica, aunque se encuentren presentes en las muestras

de parapox utilizado para elaborar el suero, o bien, la concentración de bacterias en la muestra de referencia con la cual se inmunizó es muy baja, ó resultaron poco inmunogénica para conejo.

La observación de hasta tres líneas de precipitación, indicó que el antisuero obtenido en el conejo es capaz de reconocer y reaccionar con tres determinantes antigénicos diferentes. Al comparar la procedencia de las muestras que manifestaron hasta tres líneas de precipitación, no se encontró ninguna relación entre la zona de procedencia y época del brote. (cuadro N 3).

El diferente número de bandas de precipitación sugiere diferente composición antigénica entre las cepas o por lo menos distinta concentración de los determinantes antigénicos reconocidos en cada caso, sugiriendo reacciones antigénicas entre muestras, variación que podría estar relacionada con mayor probabilidad a antígenos de superficie y explicaría recidivas de la enfermedad en animales previamente afectados y las fallas vacunales (Buddle y col. 1984)

El que en algunas muestras no se observara líneas de precipitación, sugiere la ausencia de los antígenos presentes en la muestra de referencia o baja concentración de los mismos; al mismo tiempo que permite subrayar la especificidad de la respuesta obtenida, pues descartaría a las proteínas del huésped presentes en

todas las muestras y eventualmente los anticuerpos formados contra ellas fueron eliminados del suero, al adsorber con costra traumática.

Resultó de particular interés la relación que se manifestó por IDD para los parapox bovinos (EPB y PVB); pues los virus bovinos comparten dos antígenos entre sí y uno de ellos con la muestra de referencia y otro diferente con la muestra dos de origen caprino y obtenida del mismo rancho que se obtuvieron las muestras bovinas (Figura N 2A). El resultado negativo obtenido por IDD y CIE en la muestra de viruela aviar, indicó la ausencia de relaciones antigénicas entre los parapoxvirus y los avipox.

WitteK y cols. (1980) al probar diferentes cepas de EC. y parapox bovinos, miden cinética de neutralización, y composición del genoma de las cepas se manifestaron como muy heterogéneas pero luego de iniciados los pasajes en cultivos celulares (129 pases en células BEL) el perfil fue diferente del de su progenie, debido a estas diferencias reportadas en la literatura en relación a el cambio antigénico que sufren las muestras, al ser cultivadas en cultivo celular se emplearon muestras de costra para realizar este estudio.

Bryce Buddle y col. (1984); al analizar los patrones electroforéticos de 11 cepas de E.C., encontraron que el patrón electroforético estaba formado por más de 31 polipéptidos con pesos moleculares dentro del rango de



## ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

200,000 a 18,000Kd. En este trabajo en cambio se describe un patrón electroforético formado por solo 11 polipéptidos, localizados dentro del rango de 66Kd a 9.5Kd; ésta diferencia es quizás debida a la presencia de líneas muy gruesas que posiblemente estaban formadas por varios polipéptidos; en las proteínas de pesos moleculares altos se manifestó además un ligero barrido comprendido dentro de los valores examinados por Buddle y cols., que por otra parte emplearon geles con concentraciones de 8%, 10% y 12% lo que seguramente influyó en las diferencias anotadas.

Estos autores encuentran mayor heterogenicidad en los pesos moleculares comprendidos de 44Kd a 37Kd; en lo que se coincide con éste trabajo en que la heterogenicidad se registró en los pesos moleculares de 44 Kd a 30Kd. Estos polipéptidos, según Buddle y cols., corresponden a los componentes de superficie asociados al filamento del virus de E.C.

Al comparar los patrones electroforéticos de las diferentes muestras, se encontró que algunas muestras: la 22, 9213 y la de referencia (UC, y PP) presentan, un patrón electroforético muy semejante, pese a que la muestra 22 es de Tepic Nayarit, la de referencia de Baja California Sur y la 9213 del Estado de México. Mientras que las muestras 20, 19, 16, 1, 9107+9109; presentan patrones electroforético de menor similitud y las 20 y 24 no manifiestan el polipéptido de 9.5 Kd. No es

conocido cuantas cepas de virus existen y la importancia de su variación en la epidemiología de la enfermedad. (Robinson G.Ellis y Balasu T. 1982).

En el patrón electroforético obtenido entre las muestras de parapoxvirus demostró la existencia de una proteína comun a todo el género de parapoxvirus de 55 Kd y dos proteínas de 17 Kd, y una proteína de 9.5 Kd que se manifestaron en casi todas las cepas de parapoxvirus excepto en las muestras 20 y 24. Los polipéptidos de mayor frecuencia son: 48 KD y 35 KD presentes en 10 muestras y la de 45 Kd y 15Kd en 8 muestras. Hay polipéptidos que aparecieron con menor frecuencia, 45 KD, 31 Kd, y 25 KD; estos pueden ser polipéptidos relacionados con la diversidad de la reacción antigénica presente en las diferentes muestras de parapoxvirus (cuadro N 9).

El análisis por IDD y CIE de muestras de EC de distintos partes de México, había demostrado su identidad, exceptuando dos muestras una ovina y otra caprina, que incluso en seroneutralización pudieran caracterizarse como serotipos distintos (Tórtora y García, 1987). En este trabajo 7 de las muestras ensayadas compartieron un antígeno en identidad y tres de ellos mostraron dos líneas de identidad con la muestra de referencia. Los corrimientos electroforéticos permitieron demostrar sin embargo, una mayor variación entre las muestras, aunque cabe la posibilidad de que

las líneas de identidad demostradas corresponden a las proteínas de 55 Kd, 17Kd y 9.5 Kd, comunes a la mayoría de las muestras incluídas las bovinas. Aunque las proteínas de 17 y 9.5Kd, no tendrían un peso adecuado para resultar inmunogénicas, que tal vez, son parte de los complejos lipoproteicos de cubierta propuestos por Mitchiner 1969.

En la prueba de inmunotransferencia se observa que los que son reconocidas por el suero se encuentran en el rango de 63 Kd a 25 Kd, dentro del grupo de mayor heterogenicidad coincidiendo con lo señalado por Buddle y col (1984), en cuanto a que estos polipéptidos probablemente corresponden a antígenos de superficie particularmente de filamento (Rosembush 1983); lo que hace pensar en la gran importancia del filamento de los parapox en la respuesta inmune de carácter humoral.

Además se observa que el suero inmune de conejo, preparado con la cepa de referencia de E.C. reconoció proteínas del virus de PVB, reforzando la indicada relación antigénica existente, entre los miembros del género parapoxviridae (Huck 1964 Papadopoulos(1968). Entre las proteínas reconocidas se encuentre la de 55Kd común a todos los parapox y probablemente relacionada a las líneas de precipitación comunes entre EC.,EPB y PVB, La inmunotranferencia demostró una mayor resolución y permitió apreciar dos líneas en 55Kd y 54Kd, no observadas en la electroforesis, ambas proteínas fueron

comunes a todas las muestras.

Estos resultados por IDD, CIE, patrones electroforéticos, e inmunotransferencia, muestran que existe relaciones entre los parapoxvirus y que además se manifiesta una importante heterogenicidad aún entre las muestras de ectima contagioso; esto también esta de acuerdo con Sawhney 1966, Precausta y Stellman 1973, Buddle, B., 1984; esta heterogenicidad presente entre las cepas de ectima contagioso, podría explicar las fallas existentes en la vacunación con ectima contagioso. Y refuerza la propuesta de que si se vacuna a un hato, es preferible vacunar con la cepa presente dentro del hato, para evitar introducir nuevas cepas a el mismo y evitar las fallas vacunales. Los resultados obtenidos con EC, PVB, y EPB de un mismo ramcho permite proponer el uso cruzado de las cepas en programas de vacunacion, es decir, vacunar ovinos y caprinos con cepas de bovinos y viceversa, lo cual requiere por supuesto de mayor investigación.

Mediante tinción negativa se pudieron ver en las 32 muestras ensayadas de diferente procedencia y fecha de aparición del brote; la presencia de partículas virales, predominando las partículas de tipo II de los parapox. Al comparar entre las técnicas usadas para el diagnóstico: CIE, IDD y tinción negativa (microscopía electrónica), se comprobó que la técnica de microscopía electrónica; es más sensible, pues resultó positiva en

todos los casos observados. (Cuadro N.5), mientras que por técnicas de IDD y CIE algunas muestras no manifiestan reacción positiva (Cuadro N.2 y N.3).

Con el propósito de poder diferenciar muestras de parapox (ectima contagioso, estomatitis papular y pseudoviruela bovina); fue realizada la prueba de inmunomicroscopía electrónica, propuesta por Rosembush (1983) para diferenciar cepas de parapox, usando el suero homólogo del animal convaleciente. La diferenciación entre estas muestras se establece de acuerdo a la presencia de la corola de anticuerpos alrededor de la partícula viral (cepas con corola y cepas sin corola). En este estudio se realizó la técnica de inmunomicroscopía electrónica, con 32 muestras de ectima contagioso, una muestra de estomatitis papular bovina y otra muestra de pseudoviruela bovina; con un suero inmune antiectima preparado en conejo; encontrándose que todas las muestras sometidas a la prueba, manifestaron estructuras virales con corola y estructuras virales sin corola aún dentro de la misma muestra de virus. (Cuadro N.3).

De estos resultados se concluye que la técnica de inmunomicroscopía electrónica no es aplicable a la diferenciación de cepas de parapoxvirus; además el suero inmune preparado en conejo reacciona no únicamente con su homólogo sino que también con virus diferentes como pseudoviruela y estomatitis papular bovina, de acuerdo a

la relación inmunológica que existe entre las especies del género parapoxvirus, demostrada en IDD y CIE.

La cepa # 20 de cabra es la que mostró menor cantidad de polipéptidos en la electroforesis y coincidentemente al relacionar la reacción inmunológica de esta cepa, se observó que no manifestó reacción antígeno-anticuerpo por las técnicas de IDD y CIE ni desarrolló corola en la prueba de inmunomicroscopia electrónica, además de que solo presentó formas tipo II, por lo que quizás no se manifestaron los determinantes antigénicos de cubierta, presentes en el resto de la muestras.

Es posible que al haber empleado macerados de costras para estos ensayos, la corola formada se debe a reacciones con anticuerpos exudados en la reacción inflamatoria original, sin embargo si este fuera el caso debería haberse esperado la observación de muestras donde todas las partículas presentaran corola. También es posible que los resultados se deban a la presencia de virus con diferente estructura antigénica en una misma muestra, como ha sido demostrado en estudios de análisis de genoma a partir de costras (Robinson y cols 1983)

## BIBLIOGRAFIA

- AGUILAR-Setien, A. Correa, P.; Hernández, E.; Cruz, A. & Hernández P. (1980) Bovine papular stomatitis, first report of the disease in México. *Cornell Vet.* 70 : 10-18.
- ARMESTO-RA, Gollan-A; Pinotti-M; De Baroni A.C.;García M: (1988) Bovine papular stomatitis: First isolation of ota agent in Argentina and experimental reproduction of the disease. *Vet. Argent* 5: 18-21.
- BECK, C.C. & Taylor, W. (1974) Orf: it's awfull. *VM/SAC* 69:1413-1417.
- BLAKEMORE, F; Abdussalam, M. & Goldsmith, W. (1948) A case of orf (Contagious pustular dermatitis): Identification of the virus. *Br.J.Derm.* 60: 404-409.
- BLOOD, D. A. (1971) Contagious ecthyma in Rocky Mountain bighorn sheep. *J. Wildl.Mgmt.* 35:270-275.
- BOUGHTON, I.B. & Hardy, W. (1934) Contagious ecthyma (sore mouth) of sheep and goats. *J.Am.Vet.Med.Ass.* 85:150-178.
- BOWMAN-KF; Babery-RT; Swango-LJ, Schurrenberger-PR (1981) Cutaneous form of Bovine Papular Stomatitis in man. *J.Am.Med. Assoc.* 246: 2813-2818.
- BOWEN, B., Steinberg J., Laemeli U.K., & Weintraub H (1980) The detection of DNA- Binding proteins by protein blotting, *Nucl. Acids Research.* 2:1-21
- BRUGERE-Pecoux-J, & Fedida, M. (1985) New Viruses identified in bovine respiratory diseases. *Recl.Med.Vet., EC alfort,* Paris. 1087-1091.
- BUDDLE, B.M.; Dellers, R. & Schuring, G. (1984a) Heterogeneity of ecthyma virus isolates. *Am. J.Vet.Res.* 45:75-79.
- BUDDLE, B.M.; Dellers, R. & Schuring, G. (1984b) Contagious ecthyma virus-vaccination failures. *Am.J. Vet.Res.* 45:263-266.
- BUDDLE, B.M.; & Pulford, H.D.; (1984c) Effect of passively-acquired antibodies and vaccination on the immune response to contagious ecthyma virus. *Vet. Microbiol.* 2: 515- 552.
- Callis, J.; Darderi, A.; Ferris, D.; Gay, J.; Wilder, F.; Mason, J. (1982) " Manual ilustrado para el reconocimiento y diagnóstico de ciertas enfermedades de los animales". Comisión México-Americana para la fiebre aftosa. p: 22.

- CAPURSO, A.; Trallesi, B. & Guarino, C. (1976) La prova di IDD nella diagnosi di ectima contagioso. Atti 30 Conv. Naz.Soc.Italiana Sci. Vet.XXX: 675-677.
- CRAWFORD, John, A; & Keven, M.K. (1987) Prevalence of poxvirus in population of California Quail from Oregon 1975-1987. J.Wildlife Dis. 24: 718-719.
- FASTIER, L.B. (1957) Human infections with the virus of ovine contagious pustular dermatitis (Scabby mouth). N.Z.med.J.56:121-123.
- FENNER, F; McAuslan, B.; Mims, C.; Sambrook, J. & White, D. (1974) The biology of animal viruses (2nd. edition) Acad. Press, NY, Sn Francisco, London.
- FQSTEL, R. (1964) Síntesis de las principales enfermedades que afectan a los lanares en el Uruguay. Ministerio de ganadería y agricultura.
- GARDINER, M.R.; Craig, J. & Nairn, M. (1967) An unusual outbreak of contagious ecthyma (scabby mouth) in sheep. Aust. vet. J. 42: 163-165.
- GASSMAN, V; WYLER R., & Wittek. (1985) "Analysis of Parapoxvirus Genomes" Arch Virol. 83: 17-131.
- HAXTEL Eugenie, M.D., William C., Gentry Fr. M.D. Y Zelackson Alvin S Z. (1975) Human ORF with electron microscopic identification of the virus 2ª edición CUTIS.
- HUGH-J.H.; Sheridan-JF. (1988) Enhanced production of poxvirus by high speed rolling. J.Virol Methods 22:75-80.
- HARKNES, J.W.; Scott, A. & Hebert, C. (1977) Electron microscopy in the rapid diagnosis of orf.Br. vet. J. 132: 81-87.
- HEBERT, D.M.; Samuel, W. & Smith, G. (1977) Contagious ecthyma in mountain goat of Coastal British Columbia. J. Wildl. Dis. 13: 135-136.
- HORGAN, E.S. & Haseeb, M. (1947a) The immunological relationships of strains of contagious pustular dermatitis virus. J. Comp. Path. 57: 1-7.
- HORGAN, E.S. & Haseeb, M. (1947b) The relationship between the virus of contagious pustular dermatitis and a virus isolated from sheep papillomatosis by Selbie. J. Comp. Path. 57: 8-12.
- HOWARTH, J.A. (1929) Infectious pustular dermatitis of sheep and goats. J. Am. Vet. Med. Ass. 75: 741-760.



- HUSSAIN-KA; Burger-D. (1989). *In vivo* and *in vitro* characteristics of contagious ecthyma virus isolates: Host response, mechanism. *Vet. Microbiol.* 19: 23-36.
- HUTYRA, F. & Marek, J. (1916) *Patologia speciale e terapia degli animali domestici*. Trad. G. Gerosa, Ed. F. Vallardi (Milano).
- KERRY, J.B. & Powell, D.G. (1971) The vaccination of young lambs against contagious pustular dermatitis. *Vet. Rec.* 88: 671-672.
- KLUGE, J.P.; Cheville, N. & Peery, T. (1972) Ultrastructural studies of contagious ecthyma in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 33: 1191-1200.
- KOPTOPOULUS, G.; Reid, H.W. & Pow, I. (1982) Cytotoxic antibodies of in orf virus infection sheep. *Zentralbl.Veterinaarmed. Reihe B.* 29:284-291.
- KUMMENAJE, K. & Krogsrud, J. (1978) Contagious ecthyma (orf) in the musk ox (*Ovibos moschatus*). *Actavet. scand.* 19: 461-462.
- KUMMENAJE, K. & Krogsrud, J. (1979) Contagious ecthyma (orf) in reindeer (*Rangifer tarandus*). *Vet. Rec.* 105: 60-61.
- LAEMMLI, U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685.
- LEANIZ, R. (1971) Ectima contagioso de los lanares. Conferencia, Fac. Vet. Montevideo Uruguay.
- LE JAN, C.; Haridon, R.; Madelaine, M.; Cornu, C. & Asso, J. (1978) Transfer of antibodies against the CPD virus through colostrum and milk. *Ann. Rech. Vet.* 9: 343-346.
- LINNABARY, R.D.; Powell, H.; Holscher, M. & Walker, B. (1976) Contagious ecthyma (orf) in a goat herd. *VM/SAC* 71: 1261-1263.
- MATTEWS, R.E.F. (1982) Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of viruses. *Intervirol.* 17: 42-43.
- MITCHINER, M.B. (1969) The envelope of vaccinia and orf viruses: and electron-cytochemical investigation. *J. gen. Virol.* 5: 211-220.

- MORALES, G.A. & Van Kruiningen, H. (1971) Contagious ovine ecthyma with primary lesion of the rumen and concurrent phycomycosis: A case report. *Am. J. Vet. Res.* 32: 163-166.
- MORRISON, D.K.; Carter, J.K. & Mayer R.W. (1985) Isolation and characterization of monoclonal antibodies directed against two subunits of rabbit poxvirus associated DNA directional RNA polimerasa. *J. Virol.* 55: 670-680.
- MOUSSA-A; Espenasse-J; Fedida-M; Lamblin-J; Valentin-F; Colnacapp-A; Vigouroux-A; Zanchetta-J. M. (1983). Clinical and Virological Diagnosis of pseudo-cowpox. *Recl. Med. Vet., Ec. Alfort, Paris., 1983.* 159: 1191-1195.
- NAGINGTON, J.; Tee, G. & Smith, J. (1965) Milker's nodule virus infections in Dorset and their similarity to orf. *Nature* 208: 505-507.
- NAGINGTON, J.; Lauder, I. & Smith, J. (1967) Bovine papular stomatitis, pseudocowpox and milker's nodules. *Vet. Rec.* 81: 306-313.
- NAGINGTON, J. & Whittle, C (1961) Human orf. Isolation of the virus by tissue culture. *Br. Med. J.* 2: 1324-1327.
- NEVINS, J.R. & Joklik, W.K.; (1977) Isolation and properties of the vaccinia virus DNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 252: 6930-6938.
- OBI, T.U. & Gibbs, E. (1978) Orf in sheep and goats in Nigeria. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 10: 233-235.
- OKOH, A.E.J. (1980) Contagious ecthyma in exotic sheep in Nigeria. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 12: 192.
- PAPADOPOULOS, O.A.; Dawson, P.; Huck, R. & Stuart, P. (1968) Agar gel diffusion studies of paravaccinia viruses. *J. Comp. Path.* 78: 219-225.
- PETERS, D. ; Muller, G. & Buttner, D. (1964) The fine structure of paravaccinia viruses. *Virol.* 23: 609-611.
- PLOWRIGHT, W.; Witcomb, M. & Ferris, R. (1959) Studies with a strains of contagious pustular dermatitis virus in tissue culture. *Arch. ges. Virusforsch.* 9: 214-231.
- POSPISCHIL, A. & Bachmann, P.A. (1980) Nuclear changes in cell infected with parapoxviruses stomatitis papulosa and orf: and "in vivo" and "in vitro" ultrastructural study. *J.*

gen. Virol. 7:113-121.

- POULAIN, J.; Gourreau, J.M. & Dautigny, A. (1972) Ecthyma contagieux du mouton: Anticorps sériques neutralisants. Ann. Rech. vétér. 3: 571-579.
- PRECAUSTA, P. & Stellmann, C. (1974) Ecthyma contagieux du mouton. Comparaison "in vitro" de cinq souches. Rev. Méd. Vét. 125: 697-709.
- PURAN Chand; V.D.P. R. Garg, S.K.; Singh, I.P. & Chandra; R. (1985) Counterimmuno-electrophoresis for rapid diagnosis of sheep pox Br. Vet. J. 141: 1222-128.
- RAFFI, F.; & Burger, D.; (1985) Comparison of contagious ecthyma virus genomes by restriction endonucleases. Arch Virol. 84: 283-289.
- ROBINSON, A.J. & Balassu, T. (1981) Contagious pustular dermatitis (ORF). Vet. Bull. 51:771-782.
- ROBINSON A.J.; Ellis, G. & Balassu, T. (1982) The genome of orf virus: Restriction endonuclease analysis of viral DNA isolated from lesion of orf in sheep. Arch. Virol. 71: 43-55
- ROBINSON, A.J. & Petterson (1983) Prevalence of contagious pustular dermatitis (ORF) in six million lambs at slaughter: a three-year study. N.Z.Vet.J. 31: 161-163.
- ROBINSON A.J.; Barns, G.; Fraser, K.; Carpenter, E.; & Mercer, A.A.; (1987). Conservation and variation in orf virus genomes Virology 157: 13-23.
- RODRIGUEZ R.A.; Gollan, A.; Pinotti, M.; De Baroni, A.C.; García, M. (1988) Estomatitis Papular Bovina: Primer aislamiento del agente causal en la República Argentina y reproducción experimental de la enfermedad. Vet. Arg. 5: 18-21.
- ROMERO-Mercado, C.H. McPhetherson, E.A.; Laing, A.; Lawson, J. y Scott, G. (1973) Virus particles and antigens in experimental orf scabs. Arch. ges. Virusforsch. 40:152-158.
- ROSEBUSCH, R. Ree, D.E. (1982) Reaction of convalescent bovine antisera with strain-specific antigens of parapoxvirus, Am.J. Vet. Res. 44:875-878.
- SAMUEL, W.M.; Chalmers, G.; Stelfux, J.; Loewen, A. y Thomsen, J. (1975) Contagious ecthyma in bighorn sheep and mountain

- goat in western Canada. *J.Wildl.Dis.* 11:26-31.
- SAWHNEY A.N. & Spasova, N.(1973) Propagation of ecthyma contagiosum virus in avian tissues: Electron microscopical evidence of multiplication. *Indian J.Exp.Biol.* 11:251-252.
- SAWHNEY, A.N.(1966a) Studies on the virus of ecthyma contagiosum, II-Demostration of haemagglutinins. *Acad.Bulgare Sci. Bull. Inst.Microbiol.* 18:173-17
- SAWHNEY, A.N.; Diagnosis of contagious pustular dermatitis in sheep and goat by agar-gel precipitation test. *Indian Vet. J.* 50:606-607.
- SCOOTT-AC; Keymer-IF; Labram-J (1981) Parapoxvirus infection of the red squirrel (*Sciurus vulgaris*). *Vet. Rec.* 109:202.
- SHELLEY-W.B.; Shelley-ED.(1983) Farmyard pox:parapoxvirus infection in man. *Br.J.Dermatol.*108: 725-727.
- SINGH,I.P.; Pandey,R. & Srivastava,R.(1979) Sheep pox: a review. *Vet.Bull.* 49:145-154.
- SNIDER-T.G.,III; Mc Connell-s; Pierce-KR.(1982).Increased incidence of bovine papular stomatitis in neonatal calves. *Arch, Virol.*71: 251-258.
- THOMAS, V.; Flores, L; & Holowczak, J.(1980) Biochemical and electron microscopic studies of the replication and composition of milker's node virus. *J.Virol.* 34:244-255.
- TORTORA, Peréz J.L. (1985) Ectima contagioso en ovinos y caprinos. Tesis de Maestría.FES-Cuautitlán UNAM.
- TORTORA Peréz,J.L.; & García J.C.; (1987) Relaciones antigénicas entre diferentes muestras de ectima contagioso (ORF) de México. *Téc. Pec.Méx.* 25:31-40.
- VALDER, W.A.; Straub, O.;Thiel, W.; Wachendorfer, G. & Zettl, K. (1979) Ecthyma contagiosum de Schafes-Wandel des Klinischen Bildes. *Tierarztl. Umschau.* 34:824-836
- WACHENDORFER, G. Von & Valder, W. (1980) Erfahrungen mit der Prophylaxe gegen Ecthyma contagiosum beim Schaf . *Prakt. Tierarzt* 61:479-482.
- WITTEK, R; Herlyn, M.; Schumperli, D.; Bachmann, P. ;Mayr, A. & Wyler, R. (1980) Genetic and antigenic heterogeneity of different parapoxvirus strains. *Intervirol.* 13:33-41.
- Zebrowski,L.; Wasowski, Z.;Pasternak, W. & Karpinski, S. (1974) Isolation and characteristics of ecthyma virus occurring in Poland. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 18:72-79.