



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma
de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

11680

1
2ej

Ectima Contagioso en Ovinos y Caprinos
Inmunidad y Patogenia en Recién Nacidos

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
(AREA: MICROBIOLOGIA)**

POR

JORGE L. TORTORA PEREZ

ASESOR:

DR. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-CUAUTITLAN

COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARTA DE VOTOS APROBATORIOS

Coordinación General de Estudios de Posgrado
FES - Cuautitlán
Presente.

Por medio de la presente nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis titulada "ECTIMA CONTAGIOSO EN OVINOS Y CAPRINOS, INMUNIDAD Y PATOGENIA EN RECIEN NACIDOS"

que presenta el (la) alumno (a) JORGE LUIS TORTORA PEREZ

con Núm. de cuenta 8080477-0 N° Exp. 37977

para obtener el grado de DOCTORADO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGIA)

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el Examen de Grado correspondiente, otorgamos el voto aprobatorio.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

CUAUTITLAN IZCALLI, MEX., a 2 de JUNIO de 19 94

PRESIDENTE: DR. ELISEO HERNANDEZ B.

PRIMER VOCAL: DR. ANTONIO MORILLA

SEGUNDO VOCAL: DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

TERCER VOCAL: DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ C.

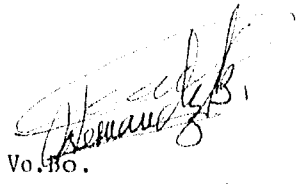
SECRETARIO: DR. FRANCISCO TRIGO TAVERA

SUPLENTE: DR. ALVARO AGUILAR SETIEN

SUPLENTE: DR. MARCO ANTONIO VEGA

TESIS

COMPLETA



Vo.Bo.

Dr. Eliseo Hernández Baumgarten
Asesor de la Tesis

JURADO DEL EXAMEN:

Dr. Eliseo Hernández Baumgarten

Dr. Antonio Morilla González

Dr. Abel Ciprian Carrasco

Dr. Juan A. Montaraz Crespo

Dr. Francisco Trigo Tavera

Dr. Alvaro Aguilar Setien

Dr. Marco A. Vega López.

C O N T E N I D O:

Prólogo	1
Agradecimientos	2
Resumen	4
Abstract	5
1. INTRODUCCION	6
1.1. EL VIRUS	8
1.1.1. Características del género parapoxvirus	8
1.1.2. Estabilidad del virus	9
1.1.3. Morfología viral	11
1.1.4. Comportamiento en cultivos celulares	12
1.1.5. Especies susceptibles al virus	14
1.1.6. Variantes del virus	15
1.1.7. Composición antigénica	18
1.1.8. Características del genoma	21
1.2. LA ENFERMEDAD	24
1.2.1. Ocurrencia	24
1.2.2. Transmisión	26
1.2.3. Patogenia	27
1.2.4. La respuesta inmune cutánea	29
1.2.4.a. Células linfoides	30
1.2.4.b. Células dendríticas presentadoras de antígeno	32
1.2.4.c. Células cebadas (mastocitos)	35
1.2.4.d. Macrófagos cutáneos	36
1.2.4.e. Neutrófilos	36
1.2.4.f. Células epiteliales	38
1.2.5. La respuesta inmune en ectima conta- gioso	40
1.2.6. Protección vacunal	44
1.2.7. Protección calostrál	46
2. HIPOTESIS	48
3. OBJETIVO	48
4. MATERIAL Y METODOS	49
4.1. Animales	49

4.2. Virus.	49
4.3. Tinción negativa.	50
4.4. Inmunodifusión (IDD).	51
4.5. Contraelectroforesis (CIB).	52
4.6. Suero hiperimmune de conejo.	52
4.7. Inoculación por escarificación.	53
4.8. Pruebas de intradermorreacción.	53
5. Experimento 1. Inmunidad perinatal a EC en caprinos.	54
5.1. Material y métodos.	54
5.2. Resultados y discusión.	58
6. Experimento 2. Seguimiento de un brote natural de EC en cabras.	62
6.1. Material y métodos.	62
6.2. Resultados y discusión.	63
7. Experimento 3. Inactivación por calor del virus del Ectima contagioso.	70
7.1. Material y métodos.	71
7.2. Resultados y discusión.	72
8. Experimento 4. Evaluación de diferentes antígenos en intradermorreacción.	75
8.1. Material y métodos.	75
8.2. Resultados y discusión.	77
9. Experimento 5. Ensayos de campo de la IDR, con virus inactivado por calor.	82
9.1. Material y métodos.	83
9.2. Resultados y discusión.	84
10. Experimento 6. Respuesta de cabritos a la IDR, al desafío con EC y comportamiento en brote natural.	91
10.1. Material y métodos.	91
10.2. Resultados y discusión.	92
10.3. Resultados y discusión de los datos acumulados en los experimentos 1 y 6.	97
11. Experimento 7. Inmunidad perinatal en ovinos.	99
11.1. Material y métodos.	100
11.2. Resultados y discusión.	101

12. Experimento 8. Susceptibilidad comparada de ovinos y caprinos al EC.	104
12.1. Material y métodos.	105
12.2. Resultados y discusión.	106
13. Experimento 9. Infección mixta de EC y <u>Dermatophilus congolensis</u> .	109
13.1. Material y métodos.	110
13.2. Resultados y discusión.	111
14. Experimento 10. Infección experimental con EC y <u>D.congolensis</u> .	112
14.1. Material y métodos.	112
14.2. Resultados y discusión.	114
15. Experimento 11. Descripción de un caso humano de dermatitis por parapoxvirus.	118
16. DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES.	121
17. LITERATURA CITADA.	136.

ECTIMA CONTAGIOSO EN OVINOS Y CAPRINOS : Inmunidad y patogenia en recién nacidos.

Jorge L. Tórtora Pérez.

PRÓLOGO

En 1985 el suscrito defendió su tesis de maestría "Ectima contagioso en ovinos y caprinos" el documento escrito de esa tesis contiene una extensa y detallada revisión bibliográfica sobre el tema, que fue considerada como tal por el H. Jurado que la evaluó. Por tal motivo en este trabajo se procuró incluir en la introducción solamente aquellos aspectos estrictamente necesarios para la discusión de los resultados obtenidos en él y obviamente la actualización de conocimientos que particularmente en lo que se refiere a los mecanismos de respuesta inmune han surgido en los años siguientes a 1985.

Mientras la tesis de Maestría fue un trabajo fundamentalmente de laboratorio, en este caso predominan los esfuerzos por comprender la forma de presentación de la enfermedad en los rebaños, en sus condiciones de producción, integrando estos datos con los obtenidos en el laboratorio.

Agradecimientos

Mi primer agradecimiento es para México y su pueblo generoso, que me han permitido realizarme en plenitud académica y familiar, espero estar educando a mis hijos para que sean los ciudadanos mexicanos que el país merece, ese debe ser seguramente el mejor legado que puedo darle.

En segundo lugar es necesario agradecer ampliamente a ese estupendo grupo académico que es la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la FES Cuautitlán UNAM, donde tengo tan buenos amigos que son también ejemplo del camino a seguir en el quehacer académico y científico. Estoy muy orgulloso de pertenecer a este grupo y espero que este documento no demerite su calidad, para que siempre me consideren como uno más, en el esfuerzo porque la FES-Cuautitlán alcance los niveles de excelencia académica a la que todos aspiramos. Gracias a todos y mis disculpas por la demora en la entrega de esta tesis.

Es muy difícil intentar definir cuando comienza el proceso de formación profesional de un individuo y creo definitivamente que nunca termina, es muy difícil igualmente intentar cuantificar cuanto le debemos a todos lo que en el proceso interactúan con nuestra actividad formativa; pero estoy seguro que he tenido mucha suerte en el proceso, desde que me incorporé al grupo de Histología y Embriología en la Facultad de Veterinaria de Montevideo Uruguay, tomé la decisión de emigrar y llegar a la Universidad de Puebla y luego la de incorporarme a la ENEP-C de la UNAM. En este devenir he tenido la oportunidad de interactuar con extraordinarios maestros-compañeros, a quienes debo demasiado y solo puedo decirles gracias y cuenten conmigo.

FALTA PAGINA

No.

3

RESUMEN

Ectima contagioso en ovinos y caprinos : Inmunidad y patogenia en recién nacidos.
Jorge L. Tórtora P. (1994).

Mediante desaffo por escarificación, se confirmó que corderos hijos de madres inmunes al ectima contagioso (EC), desarrollaron lesiones en el punto de la inoculación; por el contrario, el mismo procedimiento en cabras, demostró que los cabritos resistían el desaffo hasta los 30 ($p < 0.001$) y 45 días ($p < 0.05$) de edad, sugiriendo alguna forma de resistencia a la enfermedad, ausente en los corderos de la misma edad. Se constató por contraelectroforesis (CIE), la presencia de anticuerpos contra EC en el calostro de las cabras, sin embargo no se pudo demostrar por esta técnica la presencia de anticuerpos en el suero de los cabritos lactantes antes o después del desaffo. Se demostró una elevada correlación entre la presencia o ausencia de lesiones en las cabras y sus crías, en los brotes naturales de la enfermedad ($p < 0.001$). En 12 de 17 partos gemelares se observaron las mismas respuestas de los hermanos al desaffo, la intradermorreacción (IDR) y/o el desarrollo de lesiones en el brote natural.

Las observaciones en los casos clínicos de la enfermedad, pusieron en evidencia que en ovejas y cabras, las lesiones en los pezones son independientes del amamantamiento de crías con lesiones orales de EC. En los cabritos, se observó una correlación entre la presencia de lesiones en el brote y el menor peso de los animales afectados ($p < 0.05$). En contraste, la presencia de lesiones en boca y labios, no modificó significativamente la ganancia de peso de los animales enfermos. La interacción del virus de EC con papillomavirus y *D.congolensis* en las lesiones, fue demostrada en cabras y ovinos respectivamente.

La escarificación de los cabritos redujo en forma significativa la intensidad y duración de las lesiones en los brotes de la enfermedad ($p < 0.01$). Los virus de campo y de desaffo (escarificación), determinaron líneas de precipitación con respuestas de identidad en doble inmunodifusión (IDD), enfrentados a un suero hiperinmune de conejo.

Se normalizó el uso de la IDR con virus inactivado por calor. La prueba empleada en varios ensayos demostró razonable sensibilidad (67.3%) y especificidad (81.4%), se demostraron falsos negativos, por lo que no se considera recomendable a nivel individual, pero sí como prueba de rebaño. La IDR permitió demostrar animales expuestos que no habían padecido la enfermedad y animales en fase de incubación. No existió relación entre la respuesta a IDR y la resistencia al desaffo o la enfermedad natural. El virus inactivado con formalina o luz ultravioleta, no resultó un buen antígeno para IDR, probablemente porque se observó que las partículas se deterioraban en exceso. El virus de la pseudovirueta bovina, inactivado por calor, dió respuestas semejantes al de EC en IDR y formó dos bandas de identidad en IDD.

Mediante infecciones cruzadas de diluciones de muestras de EC de origen ovino y caprino, en ovinos y cabritos respectivamente, se demostró una mayor susceptibilidad de las cabras a las 4 muestras ensayadas.

ABSTRACT

Contagious ecthyma in sheep and goats. Pathogenesis and immunity in the newborn. Jorge L. Tórtora Pérez (1994)

Lambs and kids from immunized dams were challenged with contagious ecthyma (CE) virus by scarification, between birth and two months of age. Lambs developed lesions after challenge in all cases, nevertheless kids only developed lesions after 30 days ($p < 0.001$) and 45 days ($p < 0.05$), suggesting that they were resistant to infection. A mechanism involving colostrum ingestion may be related. Antibodies to CE virus were demonstrated by countercurrent immunoelectrophoresis in caprine colostrum serum, nevertheless antibodies were not demonstrated in the serum of resistant kids using the same method.

At the outbreak of the disease, a high correlation between the presence of lesions in the dams and their kids was observed ($p < 0.001$), suggesting in both the same immune status to the disease. In the same conditions no correlations were found between teat lesions in the dams and mouth or lips lesions in their kids. Teat lesions in sheep and goats were independent from suckling. In 12 out of 17 twins of kids, the same responses were observed to challenge, delayed intradermal hypersensitivity test (DHT) and lesions developed at the outbreak.

Kids that had developed lesions at the outbreak had significantly less body weight ($p < 0.05$) and oral lesions did not modify body weight gain

The interaction between CE and papillomavirus was demonstrated in goats and with *Dermatophilus congolensis* in sheep.

Kids scarification reduced the importance and resolution of the lesions to the outbreak ($p < 0.01$). Field strains and challenge CE virus demonstrated identity precipitating lines in double immunodiffusion (DID).

DHT was standardized with heat inactivated virus ($70^{\circ}\text{C}/1\text{hr}$). The DHT demonstrated suitable sensitivity and specificity to be used at a flock level.

Exposed animals that did not get sick, animals with subclinical infection and animals during the incubation period of the disease were all positive to the DTH reaction. No relationship between DHT and the resistance to disease in field or challenge conditions was established

Heat inactivated ($70^{\circ}\text{C}/1\text{hr}$) milker's nodule virus sample gave similar reactions as CE in DHT and demonstrated identity precipitating lines in DID.

Cross infection between four sheep and goats CE samples in sheep and goats respectively demonstrated greater susceptibility of goats to the disease.

1.- INTRODUCCIÓN

El ectima contagioso u ORF, es probablemente la enfermedad más importante de las determinadas por virus del género parapoxvirus, como todas las demás enfermedades producidas por virus del grupo, es además una zoonosis, considerada sin embargo, una zoonosis menor, tanto porque el cuadro clínico es normalmente benigno, como por el hecho de que el hombre resulta ser una especie considerablemente resistente a este género viral. (Schnurrenberger et al. 1980).

La enfermedad se presenta en ovinos y caprinos con diferente intensidad y un cuadro proliferativo-papilomatoso observado en buey almizclero parece corresponder a una forma de ectima contagioso, considerando la estrecha relación observada en el genoma de los virus involucrados (Moens et al., 1990).

El análisis del material genómico y de su expresión antigénica, a través de electroforesis en gel e inmunotransferencia, ha puesto en duda la existencia de diversas especies del virus en el género de los parapoxvirus y por el contrario ha fortalecido la posibilidad de que se considere a un solo virus con gran capacidad de variación génica (Gassmann et al., 1985).

Aunque en la última década se ha avanzado sustancialmente en el conocimiento de la enfermedad, su

patogenia y respuesta inmune y más aún en el conocimiento de las características del virus; aún no se comprenden los mecanismos o situaciones que determinan la presentación de la enfermedad y no se cuenta con alternativas profilácticas adecuadas y seguras.

1.1. EL VIRUS

1.1.1. CARACTERISTICAS DEL GENERO PARAPOXVIRUS

El virus del ectima contagioso (ORF) forma parte del género Parapoxvirus, de la subfamilia Cordopoxvirinae en la familia Poxviridae. Oficialmente el género parapoxvirus está integrado por los virus del ectima contagioso (EC), la pseudoviruela bovina (PVB), la estomatitis papular bovina (EPB) y el ectima de la gamuza (Matthews 1979). Esta división sin embargo fue establecida fundamentalmente por la diferente presentación clinicopatológica de las enfermedades, pese a existir desde ya hace bastante tiempo evidencia del parentesco de estos virus (Huck, 1966; Nagington et al. 1965, 1967; Papadopoulos et al., 1968). De persistir un criterio clinicopatológico y de especie afectada, el género parapox podría incrementarse con el virus de la papilomatosis del buey almizclero, el de camélidos y con los parapoxvirus identificados en mamíferos marinos (Moens et al., 1990; Rivera et al., 1987; Osterhaus et al., 1990).

Sin embargo los problemas para distinguir serológicamente a los miembros del grupo y por el contrario las diferencias anotadas para "cepas" de un mismo virus con las mismas técnicas, aunado a los resultados obtenidos al tipificar el genoma y el mapa antigénico en geles de poliacrilamida para los distintos virus del género y sus cepas, sugieren fuertemente la posibilidad de que estos

virus conformen una sola especie con amplias variaciones quizás agrupables en tipos (Wittek et al., 1980; Robinson et al., 1982; Buddle et al., 1984 a; Robinson et al., 1987; Gassmann et al., 1985). Aún con el uso de anticuerpos monoclonales se han detectado fuertes reacciones cruzadas entre muestras de EC y de parapox bovinos (EPB y PVB), (Lard et al., 1991).

Actualmente se describen como características comunes al género, el presentar ADN de doble cadena y peso molecular de $85-88 \times 10^6$, aunque recientemente se han establecido pesos moleculares menores, 67×10^6 (Moens et al., 1990), viriones ovoides de 220-300 nm. x 140-170 nm, con cubierta externa y la presencia característica de un filamento externo grueso ordenado regularmente que le confiere a las partículas virales la morfología de un ovillo de estambre, al observarlo en tinción negativa en el microscopio electrónico. Esta particular morfología del género parapox es el elemento de mayor importancia en el diagnóstico de las enfermedades producidas por este grupo de virus (Nagington et al., 1964; Peters et al., 1964; Harkness et al., 1977).

1.1.2. ESTABILIDAD DEL VIRUS

La estabilidad del virus, medida en términos de la conservación de infectividad en diversas condiciones de pH, temperatura, luz ultravioleta y disolventes, ha sido examinada por algunos autores utilizando cultivos celulares

e incluso corderos como sistemas sensibles al virus. En 1924 Aynaud (citado por Boughton y Hardy, 1934) señalaba que el virus perdía efectividad para corderos, luego de calentar la muestra a 56° C por media hora. A 36° por 10 días, el título exponencial de una muestra ensayada en cultivos celulares primarios cayó de 5.5 a 0.3 (Plowright et al. 1959) en los mismos ensayos pero a 55°C en una hora y media, el título pasa de 6.3 a menos de 0.7. A 60°C los cambios observados en media hora variaron según la muestra y el título original, cayendo de 1.5 hasta 2.0 el exponente log. del título original, equivalente al 90% de su actividad original (Sawhney, 1972). Precausta y Stellmann (1974), señalan la estabilidad del virus en 5 muestras examinadas a 50°C. La luz ultravioleta reduce la infectividad del virus, entre 1.8 y 2.6 de su exponente original en media hora (Sawhney, 1972).

La sensibilidad del virus a los cambios de pH y a los disolventes lipídicos ha sido examinada también en términos de su infectividad y cambios estructurales (Mitchiner 1969, Precausta y Stellmann 1974, Trueblood, 1966). Los resultados en cuanto a la infectividad son contradictorios, mientras Trueblood (1966) indica que el tratamiento con éter al 20% por 24 horas a 4°C no modificó la infectividad de una muestra ensayada en corderos y cultivos celulares, Precausta y Stellmann 1974, indican una sensibilidad que consideran mediana al éter.

Respecto a la sensibilidad del virus a las condiciones del medio ambiente, ya los primeros trabajos, quizás sin mucho soporte experimental, indicaban que probablemente el virus lograba mantener su infectividad hasta por un año, aún en ambientes extremos y poco favorables para los agentes infecciosos, y que costras conservadas en un frasco ambar a temperaturas aproximadas a los 14°C, resultaron infectantes 15 meses después (Boughton y Hardy, 1934). En condiciones semejantes, se ha demostrado la infectividad del virus en costras mantenidas a temperatura ambiente por 15 años y medio (Hart et al.1949) y en costras desecadas y conservadas a 7°C, por 22 años 8 meses (Livingston y Hardy 1960).

1.1.3. MORFOLOGIA VIRAL

Como se señaló antes, la morfología de los viriones es tan peculiar que constituye la principal característica del género, aunque no permite distinguir entre los miembros del mismo. El tamaño de las partículas es de 220-300 nm x 140-170nm. Sin embargo, se han estimado tamaños de partículas algo más grandes 160 x 360nm (Moens et al.1990).

En tinción negativa con ácido fosfotúngstico, se pueden observar dos tipos de partículas, unas de superficie estriada, que se asemejan a ovillos de estambre, que son impermeables al fosfotungstato y que se denominan partículas M o de tipo 1. Su morfología resulta de la observación de un filamento de naturaleza proteica, regularmente enrollado en

la superficie del virión. Un segundo tipo de partículas, partículas C o de tipo 2, son permeables al fosfotungstato y en ellas se pueden distinguir el nucleóide y las cubiertas del virus (Nagington et al. 1964; Peters et al. 1964; Mitchiner 1969).

La proporción de formas M y C en una muestra, puede ser modificada por efecto del pH, el uso de fijadores, disolventes y sustancias desnaturizantes de proteínas, incluso el pH del fosfotungstato en la tinción negativa modifica esa proporción, incrementando la cantidad de partículas de tipo C en todos los casos (Nagington et al. 1964; Peters et al. 1964; Mitchiner 1969).

La ultracentrifugación en gradientes permite separar estos dos tipos de partículas (Robinson et al. 1982; Moens et al. 1990) y demostrar que las partículas de tipo 2 no son infectantes y todo indica que son viriones dañados y/o defectuosos, permeables por esa razón al fosfotungstato y a los componentes de los gradientes que permiten separarlos, al modificar su densidad por la penetración de los mismos (Robinson et al, 1982).

1.1.4. COMPORTAMIENTO EN CULTIVOS CELULARES.

Luego de que Greig (1957) , utilizando cultivos primarios de piel fetal ovina, demostrara la multiplicación del virus, diversos autores lo han logrado hasta el presente

en células de distinto origen, pero principalmente de origen ovino y bovino y más raramente de otras especies o en embrión de pollo (Rossi, 1973; Tórtora, 1985). En líneas celulares el virus ha demostrado un comportamiento incierto y en general con resultados negativos o con demostración de efecto citopático, pero aparentemente sin lograr viriones infectantes (Nagington et al. 1965; Tórtora, 1985).

Se ha demostrado que uno de los factores limitantes del desarrollo del virus en cultivos celulares, aún en cultivos primarios, es el suero fetal bovino, que parece contener "factores de bloqueo" de naturaleza no establecida (Nagington, 1968; Zebrowski et al. 1974; Tórtora 1985). El suero fetal de caballo se ha empleado con éxito como sustituto (Plowright et al. 1959; Nagington y Whittle, 1961; Zebrowski et al. 1974).

En tiempo más reciente se ha demostrado que el virus adaptado a cultivos celulares modifica sensiblemente su comportamiento antigénico e incluso las características de los perfiles del material genético tratado con enzimas de restricción (Wittek et al. 1980).

Estas situaciones, comportamiento irregular del virus en cultivos celulares y modificación del mismo, agregadas a la abundancia de virus presente en las lesiones clínicas de la enfermedad son, seguramente, de los elementos que definen que se haya preferido la purificación viral por centrifugación, al uso de cultivos celulares (Robinson et al. 1982; Moens et al. 1990).

1.1.5. ESPECIES SUSCEPTIBLES AL VIRUS

A pesar de la posibilidad de que el género parapox pueda estar integrado por un solo virus, situación que se discutirá más adelante, aquí se revisará la información referida a los virus de origen ovino y/o caprino.

Los ovinos y los caprinos son las especies más grave y extensamente afectadas, existe alguna evidencia de que las cabras son más severamente afectadas que los ovinos; incluso en rebaños mixtos se ha señalado la observación de lesiones en las cabras, mientras los ovinos que conviven con ellas se muestran indemnes. (Hatziolos, citado por Boughton y Hardy, 1934; Tórtora, 1985; Munz et al., 1991). Se ha señalado que el período de latencia del virus, es más corto en cabras que en ovejas infectadas experimentalmente y que la severidad de las lesiones fue también mayor en las cabras con los mismos inóculos ensayados en ambas especies (Hussain y Burger, 1989).

La enfermedad ha sido también señalada en otras especies de rumiantes domésticos y salvajes, así como en otras especies tal es el caso del perro y el conejo. El hombre, aunque poco susceptible, puede presentar lesiones, generalmente en las manos, como consecuencia del trabajo con animales enfermos o materiales contaminados (lana, cueros, canales) (Robinson y Petersen, 1983).

El caso de los bovinos debe examinarse en forma particular, considerando la posibilidad de que los parapox bovinos (EPB y PVB) y el EC sean un mismo virus y las consecuencias epizootiológicas que esta situación podría tener. Pese a lo anterior, se considera a ovinos y caprinos como especies refractarias a los virus bovinos (EPB y PVB) y no se han comunicado casos de infección natural en bovinos, aún pastoreando con ovinos y/o caprinos enfermos (Robinson y Balassu, 1981). Los intentos de infección experimental han aportado resultados contradictorios, con autores que logran reproducir lesiones en bovinos (Aynaud, 1923; Bennett et al. 1944; citados por Robinson y Balassu, 1981; Huck, 1966; Nagington, 1968) mientras otros señalan resultados negativos (Howarth 1929; Boughton y Hardy 1934; Tórtora 1985). Es necesario sin embargo, hacer notar que en ningún caso se estableció la condición inmune de los bovinos empleados respecto a los parapox y en consecuencia los resultados pudieron haber sido influídos más por la respuesta inmune de los animales empleados, que por su susceptibilidad al virus, sin que se pueda descartar la posibilidad de variantes del virus con diferente capacidad para infectar a los bovinos.

1.1.6. VARIANTES DEL VIRUS

Se puede suponer la existencia de variantes del virus a partir de los resultados contradictorios obtenidos al intentar infectar especies diferentes de los pequeños

rumiantes; la diferente susceptibilidad a la enfermedad observada en ovinos y caprinos que conviven en rebaños mixtos (Tórtora, 1985), la distinta localización anatómica y aspecto de las lesiones de ectima según el brote, y la presentación recurrente de la enfermedad en rebaños que la habían padecido o estaban "vacunados" (Beck y Taylor, 1974; Buddle et al., 1984b).

Los primeros trabajos realizados en este sentido, arrojaron resultados contradictorios al ensayar muestras de diferente origen geográfico y de especie, en ovinos vacunados y susceptibles mediante pruebas de protección cruzada (Horgan y Hasseeb, 1947). Debe destacarse sin embargo que en la época en que se realizaron estos primeros ensayos, no se podía establecer el estado inmune de los animales empleados, ni cuantificar el inóculo viral de desafío.

A pesar de las condiciones señaladas, los resultados pueden sin embargo, considerarse como sugestivos de la existencia de variantes.

En 1966 Trueblood, concluye que los virus de dermatitis ulcerativa ovina y ectima contagioso, son un mismo agente con diferente antigenicidad y presentación clínica. En el mismo año Sawhney (1966), demuestra mediante protección cruzada en ovinos y seroneutralización en cultivos celulares, diferencias antigénicas y de comportamiento entre cinco cepas de virus de diferente origen geográfico.

Precausta y Stellmann (1974), también establecen diferencias antigénicas importantes en cinco cepas ensayadas.

Con técnicas más precisas se ha podido demostrar la variación antigénica del virus luego de diferente número de pasajes celulares (Wittek et al. 1980) y que en una costra obtenida de un caso clínico, coexisten en diferente proporción al menos dos variantes del virus demostrables con técnicas de análisis de oligonucléotidos del ADN (Robinson et al., 1982).

Buddle et al. (1984 a), demuestran al revisar las relaciones antigénicas de 11 muestras de diferente origen geográfico y de especie en los Estados Unidos, que si bien los títulos son hasta 10 veces mayores al evaluar los sueros con sus muestras homólogas, en algunos casos (cuatro) las respuestas heterólogas fueron superiores a las homólogas. En México, la evaluación de 13 muestras de EC por inmunodifusión, demostró una sola línea de precipitación con respuesta de identidad, excepto en dos muestras, que evidenciaron sólo identidad parcial y que ensayadas en cultivos celulares resultaron con diferente índice de neutralización (Tórtora y García, 1987). Relaciones semejantes se demostraron con EC y dos muestras de parapox bovinos (González et al. 1991).

Los intentos por agrupar o distinguir las muestras de ectima y de los parapox en general, mediante técnicas serológicas, han resultado en situaciones contradictorias que sólo permiten establecer diferencias menores y han

demostrado por el contrario una fuerte correlación serológica entre las muestras, incluso de diferente origen en cuanto a especie animal afectada (Huck 1966; Papadopoulos et al.1968; Wittek et al. 1980; Buddle et al.1984a; Gassmann et al. 1985).

1.1.7. COMPOSICION ANTIGENICA

Thomas et al.(1980), examinaron en geles de poliacrilamida (PAGE) la composición peptídica de viriones de PVB, obtenidos de cultivos celulares en medio con metionina S35, tratados con Nonidet P40, mercaptoetanol y sonicación. Los autorradiogramas de estos geles permitieron distinguir 40 polipéptidos de PM entre 10 y 200 Kd. La combinación de los tratamientos y la observación en microscopía electrónica de los sedimentos resultantes permitió concluir que el filamento externo de los viriones correspondía mayoritariamente a los péptidos de 45 y 42 Kd.

En condiciones semejantes de tratamiento, Buddle et al. (1984 a), procesaron en PAGE 11 muestras de EC norteamericanas de diferente origen geográfico y de especie, obteniendo por lo menos 31 polipéptidos entre los 18 y los 200 Kd. El estudio comparativo de las 11 corridas evidenció sólo variaciones en la presencia de cuatro bandas: una de 37 Kd presente en 3 muestras, una de 44 Kd presente en 5 muestras, una de 39 Kd presente sólo en una muestra y una de 45 Kd que apareció muy nítida en 5 muestras y

presumiblemente mezclada con la de 44 Kd en las 5 que la presentaron. El tratamiento y la microscopía electrónica de los sobrenadantes, puso en evidencia que los péptidos de 37 y 44 Kd correspondían a estructuras compatibles con el filamento superficial de las muestras que los presentaban. Las pruebas de seroneutralización cruzada, coincidieron con la presencia de estos péptidos en los casos en que los sueros heterólogos superaban incluso a los homólogos, sugiriendo la importancia de estos péptidos en la respuesta inmune humoral, en forma semejante a lo señalado en los orthopoxvirus. En este trabajo también se evaluaron dos de las muestras, luego de 32 y 33 pasajes en cultivos celulares, sin observarse variaciones en las corridas electroforéticas, que apoyaran las variaciones en los índices de neutralización observadas luego de 137 pases por Wittek et al. (1980).

En 16 muestras de parapox (EPB, PVB y EC) evaluadas en México en geles de poliacrilamida se demostraron hasta 16 bandas con rangos entre 9.5 y 55 Kd, con muestras que presentaron hasta 11 bandas y otras sólo 4. La mayor variación se observó entre 35 y 48 Kd. Las dos muestras bovinas ensayadas y las 14 de EC coincidieron en dos bandas una de 55 Kd y otra de 9.5 Kd. Las muestras bovinas también presentaron en común con la mayoría de las muestras de EC una banda de 17 Kd. Una banda de 35 Kd se presentó en 10 de las 14 muestras de EC ensayadas y no se observó en las bovinas (EPB y PVB) (González 1992).

Al enfrentar los sueros de corderos infectados natural y experimentalmente a corridas electroforéticas del virus de EC desnaturalizado, mediante la técnica de inmunotransferencia, McKeever et al.(1987), lograron poner en evidencia trece determinantes antigénicos de los cuales cuatro, con pesos de 47, 45, 40 y 8 Kd, fueron comunes a todos los sueros ensayados, siendo particularmente intensa la respuesta contra la banda de 40 Kd.

La inmunotransferencia con un suero hiperinmune de conejo, ensayada en 7 de las muestras mexicanas, demostró respuestas comunes en la bandas de 55 y 54 Kd, en 5 muestras de las 7, en 48 y 51 Kd y en tres en 45 Kd (González, 1992). La evidencia así acumulada señala que la respuesta humoral se dirige, como era de esperar, fundamentalmente contra los componentes superficiales del virus, especialmente los determinantes del filamento y esta respuesta parece ser también la base de las respuestas cruzadas con parapox de origen bovino (Huck 1966; Papadopoulos et al., 1968; Tórtora y García, 1987; González et al. 1991).

Empleando anticuerpos monoclonales, se ha demostrado una importante cantidad de respuestas cruzadas entre cepas de EC y de parapox bovinos (PVB y EPB). El uso de estos anticuerpos monoclonales en pruebas de inmunotransferencia en gel, ha evidenciado que fundamentalmente reconocen proteínas entre 40 y 43 Kd en el caso de las muestras de EC y de 45-48Kd en los parapox bovinos evaluados (Lard et al., 1991).

Esta respuesta humoral parece ser poco importante en cuanto a la resolución de las lesiones o la reinfección de los animales (Pekelder et al., 1980; McKeever, 1984; Buddle et al., 1984 b); pero podría ser importante en cuanto a la presentación y diseminación sistémica del virus (Mc Keever y Reid, 1987) y podría tener algún efecto regulador sobre la respuesta celular (Yirrell et al., 1989).

1.1.8. CARACTERISTICAS DEL GENOMA.

El ADN de los parapox es de doble cadena, con extremos entrecruzados y unidos covalentemente, una longitud estimada en $46.3 \pm 0.53 \mu\text{m}$, un peso molecular entre 67 y $148 \times 10^6\text{d}$ y una proporción de C + G de 62-64/100 (Robinson et al., 1982; Wittek et al., 1979; Thomas et al., 1980; Moens et al., 1990; Raffi y Burger, 1985; Gassmann et al., 1985)

Los primeros análisis del ADN de los parapoxvirus indicaron que al igual que los orthopoxvirus, este género viral presentaba un ADN con extremos entrecruzados (eslabonados) y con posibles deleciones (Thomas et al., 1980; Menna et al., 1979; citado por Thomas et al., 1980).

El primer examen del ADN de los parapox con enzimas de restricción y examen electroforético posterior, evidenció considerables diferencias en la corrida de los fragmentos entre parapox bovinos (EPB) y ovinos (EC), pero incluso al interior de estos dos grupos, pese a que sólo se revisaron ocho muestras, 5 bovinas y 3 de EC, dos de ellas de origen

humano (Wittek et al., 1980). En este mismo trabajo las diferencias serológicas demostradas luego de pasajes celulares (137 pases) no se acompañaron de cambios importantes en la fragmentación del ADN con las endonucleasas y viceversa, las similitudes serológicas no se correspondieron con similitudes en la corrida de los fragmentos de ADN.

Con el uso de enzimas de restricción el examen de 36 casos de EC en Nueva Zelanda, evidenció la misma heterogeneidad en los fragmentos obtenidos en las distintas muestras. Indicó además variaciones entre 88 y 106.5×10^6 d en el peso del ADN de las mismas y demostró la posibilidad de que se encontrara más de un material genómico del virus, en la costra de un caso clínico (Robinson et al. 1982).

El uso combinado de enzimas de restricción para evaluar los fragmentos obtenidos por electroforesis y técnicas de hibridación cruzada entre fragmentos y muestras, ha confirmado la heterogeneidad entre muestras aún de un mismo grupo (EPB, PVB y EC). Sin embargo, las técnicas de hibridación han demostrado que el genoma de los parapox se encuentra altamente conservado en sus regiones internas y es muy similar aún entre muestras de distinto origen: EPB, PVB y EC, lo que explicaría sus similitudes serológicas; mientras que las porciones terminales son muy variables y sólo se logran reacciones de hibridación cruzada cuando se examinan muestras del mismo origen, EBP, PVB o EC. (Gassmann et al., 1985; Rafii y Burger, 1985). Estas evidencias pueden

apoyar la idea de mantener como diferentes a los tres miembros del grupo parapox y emplear las técnicas de hibridación para distinguirlos en forma confiable.

Estos trabajos también demuestran las variaciones en el peso del ADN en amplios rangos desde 70.2 a 148.5 megadaltons, en función de la presencia de los distintos fragmentos, confirmando que el virus presenta delecciones en el genoma según la muestra (Gassmann et al., 1985; Rafii y Burger, 1985). Incluso se señala la posibilidad de que la ganancia o pérdida de fragmentos se relacione con la célula infectada (Rafii y Burger 1985). No se ha examinado sin embargo, la posibilidad de que el fenómeno dependa de la producción de partículas incompletas.

El análisis por estas técnicas de 17 muestras de EC neozelandesas evidenció variaciones mínimas en el peso del ADN de 137.6 a 139.9 x 10⁶ d, y se demostró que la porción derecha del genoma era muy estable comparada con la izquierda y las porciones terminales del mismo. En estas muestras prácticamente no se demostraron delecciones importantes a diferencia de lo observado en muestras norteamericanas (Rafii y Burger, 1985) y se detectaron secuencias repetidas en los fragmentos terminales, lo que podría explicar las diferencias de tamaño en estos sectores no sólo por delecciones sino por repetición de secuencias como se ha demostrado en los orthopox (Robinson et al., 1987).

La información generada hasta el presente parece indicar que los parapox pueden comportarse como los orthopox en su habilidad de recombinación génica e incluso generar nuevas cepas de mayor virulencia en la naturaleza, como se ha demostrado en otros poxvirus (Gershon et al., 1989).

El uso de enzimas de restricción ha permitido ya demostrar la selección y/o modificación del virus de EC, en poblaciones vacunadas que enferman por cepas sustancialmente diferentes de las vacunales (Moens et al., 1990).

Parece necesaria más información que permita ligar las modificaciones (por delección o repetición) del genoma, con los cambios en las respuestas serológicas, la composición antigénica y en última instancia con la respuesta inmune de los animales expuestos, con sus esperadas repercusiones epidemiológicas.

1.2. LA ENFERMEDAD

1.2.1. OCURRENCIA

La enfermedad presenta distribución mundial (Robinson y Balassu, 1981) y en México, aunque conocida clínicamente desde tiempo atrás, la demostración del virus por microscopía electrónica ocurrió hasta 1979 (Rodríguez et al. 1979). La morbilidad es generalmente alta y entre los animales jóvenes alcanza frecuentemente el 100%; la mortalidad en cambio es muy baja y aún con complicaciones

secundarias, raramente supera el 20%. Las complicaciones más frecuentemente comunicadas son las asociaciones bacterianas con *Bacteroides necrophorus* y *Dermatophilus congolensis* (Robinson y Balassu 1981). Se ha sugerido que la asociación con *D. congolensis* podría ser mucho más frecuente de lo esperado si se evaluara en todos los casos (Podestá et al., 1984). También se considera al ectima un importante factor predisponente a la pododermatitis en cabras (Pekelder et al., 1980) y ovejas (Jensen y Swift, 1982; Katitch, 1979). Estas dos situaciones, más las muertes por inanición y la pérdida de condición en los animales afectados, son consideradas las principales causas de pérdidas por la enfermedad.

En otras complicaciones de ectima con enfermedades como peste de los pequeños rumiantes, parasitosis, neumonías o cuadros crónicos, es más difícil establecer si el EC es causa predisponente, asociación o complicación secundaria al cuadro clínico (Linnabary et al. 1976; Rodríguez et al. 1979; Morales y Van Kruiningen, 1971; Obi y Gibbs, 1978).

La enfermedad se presenta en forma estacional en las diferentes regiones, sin embargo la estacionalidad no parece relacionarse con factores climáticos y sí con el incremento y concentración de animales susceptibles, corderos y cabritos (Beck y Taylor, 1974; Robinson y Balassu, 1981).

1.2.2. TRANSMISIÓN

El problema de la transmisión no ha sido suficientemente aclarado. Es posible reproducir las lesiones mediante la escarificación o la producción de heridas, con objetos contaminados, en la piel o mucosas. Se ha sugerido la transmisión natural a partir de malezas espinosas o forrajes toscos en épocas secas de penuria forrajera (Boughton y Hardy, 1934; Hawkins et al., 1991; Gardiner et al., 1967) o por el uso de instrumentos (esquila, aretado, descole) contaminados (Beck y Taylor, 1974; Zebrowski et al., 1974; Ames et al., 1984). Estos mecanismos no explican sin embargo, la presentación explosiva de la enfermedad en los rebaños, con elevada morbilidad en pocos días, frecuentemente en animales lactantes o con disposición de forraje verde y tierno (Hawkins et al., 1991; Kery y Powell, 1971; Wachendorfer y Valder, 1980; Tórtora, 1985).

Se puede pensar en consecuencia en otras formas de transmisión como ocurre con otros poxvirus, respiratoria, insectos o incluso digestiva (Kitching y Taylor, 1985) y en la posibilidad de la presencia de latencia o de animales portadores asintomáticos, que expresarían el cuadro clínico en ciertas condiciones de cría, quizás en condiciones de estrés. Los esfuerzos por activar lesiones de EC o demostrar cambios en la respuesta inmune específica, en animales previamente expuestos, mediante la administración de inmunodepresores (corticoides) han resultado infructuosos o

han determinado resultados parciales y contradictorios (Zarnke y Dieterich, 1985; Tórtora 1985).

1.2.3. PATOGENIA

Igual que la transmisión, la patogenia no ha sido suficientemente aclarada y el modelo propuesto se apoya fundamentalmente en la observación de casos clínicos. El virus y sus lesiones sólo se han demostrado en epitelios estratificados de la piel, mucosa digestiva y genital (Tórtora, 1985).

Como se indicó más arriba, con frecuencia el EC se asocia con enfermedades o condiciones que pueden deprimir la respuesta inmune, tal es el caso de parasitosis (Linnabary et al., 1976; Rodríguez et al., 1979) la linfadenitis caseosa (Linnabary et al., 1976; Samuel et al., 1975; Okoh, 1980) las micosis (Morales y Van Kruiningen, 1971) y el parto (Beck y Taylor, 1974). También en humanos los cuadros graves de EC han coincidido con condiciones o tratamientos inmunosupresores asociados a neoplasias (Savage y Black, 1972; Leavell et al., 1968; Sánchez et al., 1985; Hunskaar, 1986). Sin embargo, los intentos por inducir lesiones o cambios serológicos a EC mediante inmunosupresores (corticoides) en animales previamente expuestos, han resultado fallidos y cuando se lograron inducir lesiones no se pudo demostrar la presencia del virus (Zarnke y Dieterich, 1985).

Las lesiones de EC se han comunicado además asociadas a procesos cicatrizales o heridas en la piel por trasquila, aretado o cortes de cola (Beck y Taylor, 1974; Ames et al., 1984; Housawi y Abu-Elzein, 1991) y reparación de quemaduras accidentales (Hosser et al.1989).

La interpretación de estos casos, muchas veces en animales expuestos o vacunados ha sido la infección de las heridas en cuestión; sin embargo también es posible que los procesos de cicatrización y reparación del epitelio, con la implícita división celular, favorezcan la multiplicación del virus (Hosser et al., 1984); (Mc Keever et al., 1988, Jenkinson et al., 1990 b) y/o determinen cambios en los mecanismos de respuesta inmune locales en la piel afectada. De hecho se ha comunicado que la resistencia de la piel a la infección experimental es mayor en los puntos que antes presentaron lesiones de EC que en el resto de la superficie cutánea. (Robinson y Balassu, 1981; McKeever et al.1988) y las lesiones se localizan particularmente en zonas con un alto recambio celular.

Más recientemente se ha demostrado la multiplicación del virus asociado a la reparación del estrato espinoso de la epidermis; aparentemente el virus se multiplicaría en keratinocitos en determinada fase de maduración. Igualmente se ha demostrado el incremento de células de Langerhans en la dermis de la piel infectada (Jenkinson et al., 1990 b,c y 1991). No se ha podido demostrar viremia en esta enfermedad, ni que el virus se multiplique en órganos internos

(pulmones, hígado, riñón, bazo, timo o macrófagos) mediante inoculación en cultivos celulares, de sangre y suspensiones de macerados tisulares sonicados, obtenidos de animales enfermos (Hussain y Burger, 1989).

1.2.4. LA RESPUESTA INMUNE CUTÁNEA.

La piel, el órgano más grande del cuerpo, es además de una barrera mecánica y órgano de relación con el medio ambiente, un importante órgano inmune. Considerando su relación con el medio ambiente y su función homeostática, esta actividad inmune no debería extrañar. Sin embargo su existencia y complejidad, aún no completamente aclarada, ha sido definida en las últimas dos décadas a partir, principalmente, de los esfuerzos por explicar los mecanismos que participan en el establecimiento de distintas neoplasias, el rechazo de injertos, así como las particularidades en la ocurrencia de diferentes formas de dermatitis alérgicas e infecciosas. Lo anterior puede explicarse en parte por el hecho de que los mecanismos inmunes cutáneos locales y sistémicos, son esencialmente de tipo celular y las técnicas para investigarlos adecuadamente se han desarrollado en los últimos años (Edelson y Fink, 1985).

Se han incrementado así, las evidencias que apoyan la hipótesis original de Fichtelius y colaboradores, 1970, de que la piel es un órgano linfático primario comparable al timo. Los acúmulos de linfocitos, presentes en la piel de

los fetos y recién nacidos, alrededor de orificios naturales, incluidas las unidades pilosebáceas, serían, según estos autores, sitios de "educación" y maduración linfocitaria, en los que las células se formarían en la capacidad de dar respuesta a los agentes exógenos y en la de distinguir entre antígenos propios y extraños (Bos y Kapsenberg, 1993).

En el sistema inmune cutáneo participan un amplio grupo de células, algunas propias de la piel, en lo que se ha descrito como tejido linfoide asociado a piel, con sus siglas en inglés SALT y de especial importancia en la respuesta inmune y otras de menor especificidad y con funciones más amplias que las de participar en los mecanismos de resistencia. En el SALT se incluyen las células de Langerhans, linfocitos T epidermotrópicos, queratinocitos productores de factor activador de timocitos cutáneos y los nódulos linfáticos que drenan la piel (Streilein 1978, citado por Bos y Kapsenberg, 1986).

El concepto de sistema inmune cutáneo (SIS en sus siglas en inglés) ha sido acuñado para englobar el SALT y el resto de los componentes celulares que participan en la integración de la respuesta inmune en piel (Bos y Kapsenberg, 1986).

1.2.4.a Células linfoides

Establecidas las técnicas para distinguir linfocitos T y B, llamó la atención que mientras la mayoría de las leucemias y

linfomas eran cánceres de células B, que no afectaban piel, los cuadros más raros, en que la piel era fuertemente infiltrada, los linfocitos involucrados eran de tipo T (Edelson y Fink, 1985). Mientras que en la piel normal las células T se encuentran esparcidas en la dermis, especialmente próximas a los plexos venosos y raramente en la epidermis, en los raros linfomas cutáneos y en las dermatitis, tienden a infiltrar en grandes cantidades el epitelio cutáneo (Edelson y Fink, 1985; Bos y Kapsenberg, 1986).

La asociación entre resistencia a dermatomycosis y el desarrollo de respuestas de hipersensibilidad retardada, demostrables en intradermoreacción con diferentes antígenos fungales, es un elemento más en apoyo a la importancia de la inmunidad celular y en particular de la participación de células T. Los modelos en ratones singénicos con injertos de piel y transfusión de linfocitos, han demostrado la importancia de los linfocitos T en la resistencia a las micosis cutáneas. Con antígenos micóticos se ha demostrado el incremento de T supresores (Thy -1+, Ly-2.2+) en los cuadros de dermatomycosis y por el contrario un claro incremento de T cooperadores (Thy-1+, Ly-2.2-) cuando se trata de animales resistentes que eliminan la infección (Calderón, 1989).

Es importante señalar aquí que el antígeno Thy1 caracteriza células T inmaduras (timocitos), como se verá más adelante, en la piel ocurren procesos de maduración y capacitación de

linfocitos T. El 85% de las células T inflamatorias de la piel, expresan el antígeno de linfocitos asociados a piel, demostrable con el empleo del anticuerpo monoclonal HECA-452, este antígeno solo se presenta en el 5% de las células T inflamatorias de otros territorios extracutáneos. En la piel normal, la mayor parte de los linfocitos T son células de memoria y el 43% expresa el antígeno de linfocitos asociados a piel (HECA-452) (Bos y Kapsenberg, 1993).

1.2.4.b Células dendríticas presentadoras de antígeno.

En este grupo celular, se incluyen una serie de células que podrían ser en realidad estadios evolutivos y funcionales de una misma célula, el mejor conocido de estos estadios es el que corresponde a la célula de Langerhans (CL). Estas células, que expresan los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), no son fagocíticas, y sí presentadoras del antígeno en superficie adherido a su membrana, tienen en común en el hombre el marcador antigénico HLA-DR+ (Calderón, 1989), y es posible que también coincidan en otros marcadores hasta ahora insuficientemente revisados (Bos y Kapsenberg, 1986). Las características antigénicas fenotípicas de las células de Langerhans (CCLL) en cultivo, parecen modificarse asociadas a los cambios funcionales de las células y este aspecto debe considerarse como un inconveniente adicional a su reconocimiento confiable (Bos y Kapsenberg, 1993). En ovinos

las CCLL presentan el antígeno MHC-II+ (Jenkinson et al., 1991).

Las CCLL han demostrado ser el más potente mecanismo de estimulación de la respuesta de linfocitos T a diferentes antígenos infecciosos y tumorales (Edelson y Fink, 1985; Calderón, 1989). Estas células derivan de la médula ósea y presentan receptores de membrana para el Fc de IgG y para C3; se ha demostrado su capacidad de producir interleucina-1. Las CCLL se disponen formando una densa red con sus prolongaciones citoplásmicas, particularmente a nivel del estrato espinoso de la epidermis, aunque también son demostrables en la dermis en contacto con las anteriores (Bos y Kaspensberg, 1986; Edelson y Fink, 1985; Calderón 1989). Las CCLL serían capaces de moverse de epidermis a dermis y eventualmente aparecer en los ganglios linfáticos regionales, así como permanentemente llegan nuevas células precursoras de las CCLL (Bos y Kaspensberg, 1986; Calderón 1989).

Los estudios con trasplantes de piel en ratones singénicos presensibilizados han demostrado que el procesamiento del antígeno por las CCLL es crítico en la resistencia, y por el contrario la respuesta nodular linfática sin procesamiento cutáneo carecía de valor. (Edelson y Fink, 1985). En estos experimentos se demostró también que las CCLL son sensibles a la luz ultravioleta y pueden eliminarse de áreas de piel con esta radiación. El tratamiento con luz ultravioleta (UV) de suspensiones celulares epidérmicas, puso en evidencia un

segundo tipo de célula dendrítica más resistente a UV denominadas células de Granstein. A diferencia de las CCLL que interactúan fundamentalmente con células T cooperadoras, las de Granstein lo hacen fundamentalmente con las T supresoras. Esta asociación podría explicar los estados de inmunosupresión local o sistémicos en los casos de daño cutáneo extenso o de radiación experimental con UV (Edelson y Fink, 1985) y la presentación de EC asociado a procesos cicatrizales o lesiones cutáneas (Hosser et al., y 1984; Mc Keever et al., 1988; Jenkinson et al., 1990).

Se ha demostrado en este grupo de células dendríticas, un tipo celular con marcadores antigénicos similares a los de las CCLL como T6+ y HLA-DR+, pero que a diferencia de las CCLL no presentan los característicos gránulos citoplásmicos de Birbeck de función desconocida. Estas células denominadas "indeterminadas" podrían ser formas evolutivas de las CCLL (Bos y Kapsenberg, 1986).

Un grupo celular de interés en la dinámica de la respuesta inmune cutánea son las denominadas células en velo, que al igual que las CCLL son HLA-DR⁺ y presentan receptores para Fc(IgG) y C3. Este grupo ha sido demostrado en el contenido de los linfáticos que drenan la piel del conejo (Bos y Kapsenberg, 1986) y una célula semejante MHC-II⁺ se ha demostrado en los ovinos (Jenkinson y col. 1991).

Otros tipos celulares dendríticos como las células interdigitadas de las zonas T dependientes o las dendríticas de las zonas B de los nódulos linfoides, no se presentan en

la piel normal, pero han sido observadas en ciertas patologías inflamatorias y tumorales (Bos y Kapsenberg, 1986).

1.2.4.c Células cebadas (mastocitos)

La posible importancia de las células cebadas (CC) en la respuesta cutánea se asocia a su capacidad de liberar sustancias vasoactivas, mediadores de la respuesta inflamatoria y factores quimiotácticos para células inflamatorias y de respuesta inmune. Su papel en la patogenia de las respuestas de hipersensibilidad está bien demostrado, como en el caso de las alergias por contacto de tipo I urticarias (Bos y Kapsenberg, 1986) y en las respuestas de intradermoreacción (Calderón 1989). El número de CC en la piel de todas las especies es por otra parte muy alto. Las células cebadas han sido subdivididas en dos subtipos (I y II) reconocibles con la técnica de Alcianblue-Safranina y se ha demostrado que las de tipo II no contienen heparina (Bos y Kapsenberg, 1986).

El uso de bloqueadores de serotonina en el ratón, ha demostrado la importancia de este mediador vasoactivo en las respuestas locales a la infección micótica, mientras que, por el contrario, se sospecha de un efecto inhibitor de la histamina en la respuesta inmune celular del humano. La infección experimental en ratones con dermatofitos, demuestra un incremento local en el número de CC y un

aumento en células degranuladas (Calderón, 1989). En ovinos experimentalmente infectados con EC no se observaron modificaciones en el número y características de las CC, pero sí se observó un incremento en basófilos a partir de las 80 horas posinfección tanto en la zona de lesión como en la periferia, aunque el papel de estas células no fue aclarado (Jenkinson et al. 1990 a). La respuesta de incremento en basófilos ocurre en la infección primaria y secundaria al virus, con mayor respuesta en la primoinfección (Jenkinson et al. 1990 b).

1.2.4.d Macrófagos cutáneos.

Aunque la dermis presenta gran cantidad de células mononucleares fagocitarias, su papel en la respuesta inmune no ha sido completamente aclarado. Sin embargo, se ha demostrado la capacidad de estas células estimuladas para inhibir la formación de colonias de dermatofitos en pruebas *in vitro* (Calderon, 1989).

1.2.4.c Neutrófilos.

La extravasación de neutrófilos en los cuadros inflamatorios y su participación en la eliminación de partículas y complejos inmunes es la función conocida de estas células, que normalmente pueden observarse en bajo número en todos los tejidos sin que se les atribuya en estos casos una función especial. Sin embargo, en la piel normal

es muy difícil observar neutrófilos extravasados (Bos y Kapsenberg, 1986).

Los neutrófilos han demostrado ser más eficientes que los macrófagos cutáneos para inhibir el desarrollo *in vitro* de colonias de dermatofitos y pueden observarse fragmentos de los hongos en el citoplasma de estas células al igual que en el caso de los mononucleares. Se considera que el efecto de inhibición de los hongos se logra por un doble mecanismo: intracelular y extracelular mediante la liberación de factores del metabolismo oxidativo (Calderón, 1989).

Los neutrófilos son las células predominantes en los infiltrados celulares cutáneos en las respuestas a garrapatas, hongos y *D. congolensis* (Jenkinson et al. 1990 a) y se han señalado también como las células dominantes en el exudado de las infecciones mixtas de EC y *D. congolensis* (Yeruham, 1991). En la infección experimental con EC se ha demostrado una respuesta bifásica con incremento de neutrófilos a las 24-36 horas, aparentemente como consecuencia del traumatismo de inoculación y otra de las 72 a las 120 horas posinoculación, atribuible a la presencia y replicación del virus en la epidermis (Abdussalam, 1957 a; Jenkinson et al. 1990 a; Yirrell et al., 1991b). La relación de los neutrófilos con las células epidérmicas dañadas por el virus, sugiere la posibilidad de que los neutrófilos pudieran estar produciendo sustancias inhibitoras de la replicación viral e incluso evitar la penetración del virus a la dermis (Jenkinson et al 1990 a).

1.2.4.f Células epiteliales.

Las células epidérmicas (queratinocitos) parecen participar en forma activa en los procesos inmunes. La sospecha de su importancia se inició con las observaciones en ratones desnudos atímicos y en la imposibilidad de separar los factores genéticos determinantes de la ausencia de timo y de producción de pelo. Por otro lado, las células epiteliales del timo, pese a su origen endodérmico, presentan características estructurales muy semejantes a las de los queratinocitos. Finalmente se logró demostrar que células T inmaduras cultivadas con queratinocitos expresan antígenos propios de células T maduras, en forma semejante a lo que ocurre en su pasaje por el timo. Sin embargo debe recordarse, que ratones normales a los que se les extirpa el timo al nacer, no logran generar células T maduras, pese a tener una piel normal, lo que sugiere que la piel es importante en los procesos de maduración celular postímicos (Edelson y Fink, 1985; Bos y Kapsenberg, 1986).

Se ha demostrado la presencia de timopoyetina en los queratinocitos, así como queratina en las células epiteliales del timo mediante inmunofluorescencia, e igualmente se han demostrado en ambos tipos celulares los factores antigénicos necesarios a la actividad hormonal relacionada con la excreción de timopoyetina (Edelson y Fink, 1985).

Finalmente se ha señalado la capacidad de los queratinocitos para producir *in vitro* un amplio grupo de citocinas: interleucinas, interferón α y β , factores estimuladores de colonias, factores de necrosis tumoral y de crecimiento y transformación celular. Estos factores probablemente no se producirían *in vivo* en condiciones normales, pero sí podría estimularse su producción y liberación en diversas condiciones de irritación cutánea (Bos y Kapsenberg, 1993; Breathnach, 1993). En estas condiciones existiría en la piel un microambiente celular que podría modificar los procesos de maduración de linfocitos T, en relación con los queratinocitos y es factible suponer la existencia de una subpoblación de estas células, diferentes a las del resto del sistema (Bos y Kapsenberg, 1986). Por otra parte en la piel no se han demostrado las vénulas de endotelio alto, que se supone son esenciales para dirigir la migración específica de órgano de las células T; por lo que se han propuesto otros mecanismos como factores antigénicos de atracción, mediadores de células cebadas (quimiotácticos) para célula T (Bos y Kapsenberg, 1986), y el incremento en la expresión de adhesinas en las células endoteliales, como consecuencia de la presencia de las diversas citocinas descritas más arriba. Es importante considerar que el 90% de las células T de la piel en humanos, se localizan en la unidad perivascular (Bos y Kapsenberg, 1993).

Los mecanismos de interacción de los distintos tipos celulares aún no han sido aclarados, pero se hipotetiza que

las CCLL serían las receptoras de los antígenos, que no pudieran ser depurados por macrófagos y neutrófilos y migrarían, quizás como células en velo, por vía linfática al nódulo respectivo. En el nódulo linfático estas células presentarían el antígeno a las células T paracorticales, las células T activadas y proliferadas, se concentrarían en el área de piel expuesta al antígeno por la interacción de los fenómenos vasculares locales y los factores mediadores de las células cebadas (Bos y Kapsenberg, 1986 y 1993).

1.2.5. LA RESPUESTA INMUNE EN ECTIMA CONTAGIOSO.

La resistencia a la enfermedad por 1 o 2 años en los animales que la han padecido naturalmente o han sido infectados con fines profilácticos (escarificación vacunal) es un hecho aceptado desde los primeros trabajos con este virus (Boughton y Hardy, 1934). La resistencia sin embargo, no parece ser en todos los casos completa y eventualmente pueden presentarse brotes consecutivos en pocos meses, lo que ha sido atribuido a variaciones antigénicas entre cepas (Sawhney, 1966 ;Buddle et al 1984 b).

La presencia de anticuerpos en animales convalescientes ha sido demostrada por diversas técnicas, pero en general la respuesta es corta y de baja intensidad, obteniéndose resultados más constantes sólo con técnicas de alta sensibilidad como ELISA y sólo excepcionalmente con otras pruebas serológicas (Poulain et al 1972; Pekelder et al 1980; Buddle et al 1984 a y b; Zarnke y Dieterich, 1985;

Tórtora y García 1987; Jenkinson et al 1990 b; McKeever et al 1987; Yirrell et al 1989 y 1991a), es posible atribuir estas bajas respuestas humorales a la presencia de anticuerpos incompletos que interfieran en las pruebas serológicas empleadas.

La demostración de que la presencia de anticuerpos no evita la presentación de lesiones (McKeever et al. 1987) y que, por el contrario, casos graves y extendidos de la enfermedad coexisten con altos títulos de anticuerpos, unido al hecho de que los anticuerpos no son protectores en otros cuadros de poxvirus, ha hecho pensar que los anticuerpos no son importantes en la protección de EC (Pekelder et al. 1980; McKeever 1984). Por este motivo los trabajos se han orientado principalmente a la demostración de la inmunidad celular. La evidencia de factores locales que hacen diferente la respuesta en distintas partes de la piel refuerza esta hipótesis (Robinson y Balassu, 1981).

Recientemente, mediante el análisis de los componentes humorales y celulares drenados por la linfa de regiones cutáneas infectadas experimentalmente con EC, se ha intentado esclarecer la participación de los diferentes factores de la respuesta inmune en EC. En un primer trabajo McKeever y Reid (1987) examinaron la linfa drenada por el ganglio supramamario de ovejas adultas infectadas experimentalmente, observando un importante incremento en el número de linfoblastos a los 5-7 días posinfección (PI) y

hasta los 6-10 días, coincidiendo con la etapa de vesículas en la lesión, para luego declinar hasta el día 20 PI.

La mayoría de esos linfoblastos eran precursores de células productoras de IgG y sólo menos del 2% de IgM, lo que no debe llamar la atención considerando que se trataba de ovejas adultas que demostraron bajos títulos de anticuerpos en ELISA, antes de la infección. Un importante aumento de células T se demostró al día 11, coincidiendo con el incremento linfoblástico, incluso algunas células blasto se identificaron como precursoras de células T. Curiosamente sólo un animal de cuatro, incrementó significativamente sus títulos de anticuerpos demostrables por ELISA. Se ha demostrado que las células T que se incrementan presentan los antígenos MHC de clase II (Yirrell et al. 1991a). Con esta metodología se ha demostrado también la reducción en el drenaje linfático de ganglios de territorios cutáneos infectados, de macrófagos mononucleares y en contraste el incremento de células linfoproliferativas y acetilcolinesterasa positivas, identificadas, las últimas, como células de Langerhans (Yirrell et al., 1991b).

No se ha podido demostrar la presencia de interferón ni en las zonas de piel afectadas, ni circulante, durante los 16-24 días posinfección (Hussain y Burger, 1989). Sin embargo, sí se demostraron bajos niveles de un efecto de tipo interferón en la linfa que drena la zona de lesión en los primeros dos días posinfección, así como en los sobrenadantes de las células linfoides recuperadas de ese

mismo drenaje linfático entre los días 4 y 6 PI, este efecto se estableció por la capacidad de los sobrenadantes ensayados, de bloquear la infección viral en cultivos celulares (Yirrell et al. 1991a).

La evaluación de anticuerpos y respuestas de proliferación linfoide ha resultado en patrones muy variables entre los animales en experimentación, pero parecen indicar que la presencia de anticuerpos y respuestas de linfocitos B, reduce la respuesta de proliferación en células T periféricas (Yirrell et al. 1989).

Mediante la evaluación del peso del ganglio poplíteo y de las células drenadas por éste, en el lado de la lesión experimental y en el del lado opuesto, Yirrell et al. (1991a), pusieron en evidencia el carácter local de la respuesta, al demostrar que ésta sólo ocurre en el ganglio que drena la zona de lesión, sin afectar al ganglio contralateral ni al mesentérico como control. En este trabajo se corroboró la observación de McKeever y Reid (1987), en cuanto a que la respuesta ganglionar no generaba una respuesta de anticuerpos importante.

El uso del virus del ectima contagioso como agente parainmunizador, por autores alemanes, ha evidenciado su capacidad de inducir mayores niveles de interferón sérico y de activar células NK en ratones desafiados con el virus de Aujeszky. Se ha demostrado también su capacidad de estimular, aunque en menor grado, los factores séricos estimuladores de colonias (Büttner et al. 1987).

El uso de la intradermoreacción (IDR) parece ser una buena alternativa para medir la respuesta inmune posvacunal, utilizando virus calentado como antígeno; sin embargo, no ha sido suficientemente ensayada (Buddle y Pulford, 1984) y debe considerarse su carácter invasivo, que podría inducir procesos de sensibilización antigénica y viceversa.

1.2.6. PROTECCIÓN VACUNAL.

Como en otros virus y en particular los capripox (Fassi-Fehri et al. 1984; Mahnel y Munz, 1987; Mohanty y Rai, 1989) se han intentado desarrollar vacunas contra EC mediante la atenuación del virus en otras especies como los conejos (Abdussalam, 1957 b) o mediante pases en cultivos celulares (Ramyar, 1973; Wachendörfer y Valder, 1980; Mayr, 1980; Rossi, 1973). Los resultados sin embargo, no han sido convincentes. El pase en conejos no ha logrado atenuar el virus y resulta inconstante en sus resultados (Abdussalam, 1957 b; Tórtora, 1985). Los inmunógenos obtenidos en pases celulares tampoco parecen perder su virulencia, se ha señalado que inducen respuestas inmunes de menor intensidad y duración (Buddle et al., 1984 b; Pye, 1990; Mahnel y Munz, 1987) y se ha demostrado modificación en el ADN y la condición antigénica del virus luego de pases sucesivos (Wittek et al., 1980). Por otra parte se ha señalado el pasaje de la cepa vacunal a animales no vacunados que convivían con los primeros, lo que no resulta curioso

considerando la sobrevivencia del virus en el ambiente y el procedimiento "abierto" de vacunación por escarificación (Pekelder et al., 1980).

Pese a lo anterior, autores alemanes han preconizado el uso de una cepa vacunal de alto pasaje en pulmón bovino a la que describen como atenuada y apatógena; la vacuna se aplica con un agente "parainmunizante", un avipox, por vía subcutánea reduciendo el riesgo de diseminación de la cepa vacunal; el producto ha sido evaluado aparentemente con buenos resultados en desafíos naturales, con cuadros clínicos más benévolos y con menor morbilidad en los animales vacunados que en los controles (Wachendörfer y Valder, 1980; Mayr, 1980; Mahnel y Munz, 1987).

Un importante problema adicional, es que no se ha podido establecer un adecuado mecanismo de desafío. Normalmente se utiliza el desafío por escarificación, con el inconveniente de que el virus es puesto en contacto directo con las células epidérmicas susceptibles sin dar oportunidad de actuar a la respuesta inmune sistémica. El procedimiento evalúa fundamentalmente respuestas celulares locales y de hecho se ha demostrado una diferente respuesta a la escarificación en la piel del mismo animal en zonas previamente expuestas al virus y en las zonas control no expuestas (Robinson y Balassu 1981; Yirrell et al. 1989). Es muy probable que este mecanismo de desafío no reproduzca adecuadamente lo que ocurre en la naturaleza.

La observación de modificaciones en el material genético del virus, en poblaciones vacunadas, puede ser un mecanismo de "escape o de selección" de cepas no cubiertas por la respuesta inmune de la población vacunada (Moens et al 1990).

1.2.7. PROTECCIÓN CALOSTRAL

En 1972 Poulain et al. demostraron la presencia de anticuerpos neutralizantes en animales enfermos y convalecientes, la mayor parte de esta actividad correspondía según los autores a IgG. En este mismo trabajo se señala la presencia de anticuerpos en corderos, amamantados por hembras consideradas inmunes, en cantidades que se consideraron protectoras al menos hasta las tres semanas de vida. Con metodología más discutible Le Jan et al. (1978) y Verdés et al. (1989) llegan a la misma conclusión en cuanto a la presencia de anticuerpos en el calostro de ovejas expuestas al virus y vacunadas, señalando una clara correlación entre los índices de neutralización en el suero de la oveja, el calostro y el suero del cordero lactante. Se propone además la posibilidad de un efecto local, tópico, del calostro y la leche que humedecen los labios y la mucosa digestiva superior en el momento y luego, del amamantamiento. Sin embargo en ninguno de estos trabajos los animales se desafían para evaluar su respuesta.

En contraste, se han demostrado títulos más elevados de anticuerpos precipitantes en inmunodifusión, contra estomatitis papular bovina, en el calostro que en el suero de las vacas estudiadas (Aguilar Setián, 1980).

Contra lo anterior, se ha insistido en la ausencia de protección calostrual en los ovinos contra el EC, a partir de la observación de lesiones de la enfermedad en corderos, expuestos o desafiados, hijos de ovejas vacunadas o que habían padecido la enfermedad natural (Boughton y Hardy, 1934; Kerry y Powell, 1971; Valder et al. 1979; Verdes et al., 1989).

Utilizando la técnica de ELISA, se ha demostrado el paso proporcional de anticuerpos del suero al calostro de ovejas inmunes y al suero de los corderos amamantados por ellas. Sin embargo, los corderos desarrollaron lesiones al desafío y no se observó correlación entre los títulos séricos y la respuesta al desafío. Los corderos vacunados en la primera semana resistieron el desafío y se observó que desarrollaban una respuesta positiva a la intradermoreacción con virus inactivado por calor. La prueba intradérmica se comportó como un buen indicador de inmunidad y correlacionó con la respuesta de los corderos al desafío, soportando la idea de que la inmunidad a EC es más celular que humoral (Buddle y Pulford, 1984). No se han comunicado observaciones en torno a la protección calostrual en cabras.

2.- HIPOTESIS

2a.- El ectima contagioso (EC) no se transmite en forma directa, a partir de la contaminación de heridas por el virus.

2b.- En EC no existen diferencias de susceptibilidad, atribuibles a la edad o la especie afectada (ovinos o caprinos).

2c.- En EC no existen animales portadores asintomáticos, ni la posibilidad de ponerlos en evidencia.

2d.- La escarificación de los animales empleando el virus de EC virulento, no es una alternativa profiláctica que reduzca o impida la presentación de lesiones de la enfermedad.

2e.- En EC no existe protección (inmunidad) calostrual.

2f.- Las variaciones antigénicas del virus no modifican el comportamiento epidemiológico de la enfermedad.

2g.- No existen relaciones epidemiológicas entre el EC y los parapox de origen bovino.

3.- OBJETIVO

El principal objetivo de la serie de experimentos que se presentan en esta tesis, fue intentar esclarecer los mecanismos patogénicos y de respuesta inmune que pueden modificar el comportamiento de la enfermedad en las condiciones de cría del país y aportar nueva evidencia a las hipótesis planteadas. En cada experimento se establecerán además, sus objetivos particulares.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

A los efectos de facilitar el seguimiento de los trabajos en cuanto a su desarrollo experimental, se plantean por separado cada uno de ellos, incluyendo la metodología, los resultados y la discusión particulares. Sin embargo, los materiales y las herramientas metodológicas ampliamente empleadas, se describirán en primer término, para evitar reiteraciones, así como al final se intentarán resumir las observaciones en una discusión general de los resultados.

4.1. ANIMALES.

En todos los casos se emplearon rebaños convencionales y dada la amplia distribución de la enfermedad en el país, presumiblemente expuestos al virus. En algunos casos, la exposición previa se conocía por la presencia de brotes recientes o bien porque los animales resultaron reactores a la prueba de intradermoreacción (IDR).

4.2. VIRUS.

Se manejaron según el experimento, virus de diferente origen: ovino, caprino, y bovino, obtenido a partir de costras o biopsias de lesiones sugestivas de EC o de las formas bovinas de estomatitis papular bovina (EPB) o pseudoviruela bovina (PVB) (Tórtora, 1987). El material de lesión se maceró en mortero tipo TenBroeck en solución de

medio mínimo esencial para cultivos celulares (MEM) sin suero o en PBS, adicionados de antibióticos (penicilina 200 UI, estreptomycin 200 mg/ml) y se centrifugó a 1000-1200 xg por 10 minutos para clarificar el inóculo, de acuerdo al procedimiento más empleado para obtener virus infectante en los parapox (Robinson et al., 1982; Yirrell et al., 1991a). En todos los casos el diagnóstico fue confirmado mediante la observación de las partículas características de los parapox en tinción negativa al microscopio electrónico. Se utilizó, como cepa de referencia, una muestra de origen caprino obtenida en un brote de Baja California Sur en 1979, que se ha mantenido liofilizada a 4°C desde 1980 y que ha sido caracterizada de diferentes maneras: microscopía electrónica, efecto en cultivos celulares, respuesta en conejos, inactivación por calor y cualidades antigénicas (Tórtora, 1985; Tórtora y García, 1987). El mismo procedimiento de maceración y observación en tinción negativa se empleó para evaluar las costras resultantes de los tratamientos de desafío.

4.3. TINCIÓN NEGATIVA.

Sobre una gota de las suspensiones obtenidas de la maceración de costras o biopsias de lesiones sospechosas de contener virus, se colocó una rejilla de 200 cuadrículas (mesh) previamente cubierta de parlodiól y estabilizada con carbono, que se mantuvo en contacto con la suspensión por 3-

5 minutos. Las rejillas se secaron en estufa a 40°C, para luego ser colocadas sobre una gota de fosfotungstato de sodio al 1% pH 7.2, por otros 3-5 minutos, al término de este tiempo las rejillas nuevamente se colocaron en estufa a 40°C para su secado por una hora y se observaron en microscopio electrónico de transmisión JEOL 100x con un voltaje de aceleración entre 60 y 100 Kv con aumentos de 10 a 20000x.

4.4. INMUNODIFUSIÓN (IDD).

Se empleó agarosa al 1% con buffer de barbituratos LKB pH 8.6 ± 0.1 con fuerza iónica de 0.02, con sistemas de foseta central de 6 mm de diámetro y 5 o 6 fosetas periféricas de 4 mm, con una distancia de 5 mm entre fosetas, o bien sistemas de 5mm de diámetro con distancia de 3 mm. Las fosetas se llenaron dos veces con sueros y suspensiones antigénicas, incubándose por 24 horas a temperatura ambiente y 48 horas a 4°C, en una cámara húmeda. Ante la imposibilidad de reproducir el virus en cultivos celulares, en forma confiable, se emplearon como suspensiones antigénicas los sobrenadantes de la centrifugación a 1000-1200xg de los macerados de las costras. Las placas se lavaron 24 horas con PBS pH 8.6 y otras 24 horas con agua destilada, para luego ser coloreadas con negro amido al 1 por mil en una solución metanol-acético (1 g negro amido, metanol 500 ml,

agua destilada 400 ml y ácido acético 100 ml) (Tórtora y García, 1987; González et al. 1991).

4.5. CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIE).

Los geles para la prueba se prepararon de la misma forma que en IDD pero se montaron en portaobjetos, con fosetas enfrentadas o en ángulo de 45°, a una distancia de 4 a 6 mm. Se aplicó una corriente de 6-10 mA por 90 minutos, verificando la migración con una solución de azul de bromotimol al 1%. Las placas se tiñeron como en IDD (Tórtora y García, 1987).

4.6. SUERO HIPERINMUNE DE CONEJO.

Como control y para evaluar las características antigénicas de las muestras, se utilizó un suero hiperinmune de conejo obtenido mediante inoculaciones semanales de la muestra liofilizada reconstituída a medio volumen original (1 ml) por cinco veces y luego 5 veces más cada 15 días, los conejos se sangraron finalmente a blanco por punción cardíaca. Los sueros se titularon por IDD y se emplearon en las pruebas en diluciones de 1:4 y 1:8. Previo a su uso, el suero de conejo fue adsorbido con una suspensión de costra traumática de cabra, en incubación a 37°C por 24 horas y luego centrifugado a 1000 xg. Los resultados de este suero fueron contrastados satisfactoriamente con un suero de corderos convalescientes de EC al ser enfrentados en

condiciones equivalentes a suspensiones de diferentes muestras del virus (Tórtora y García, 1987).

4.7. INOCULACIÓN POR ESCARIFICACIÓN.

Los inóculos de desafío se aplicaron por escarificación. El mismo procedimiento se empleó para inducir inmunidad contra EC. Esta metodología ha sido y sigue siendo de amplio uso en los modelos experimentales y de campo con la enfermedad (Boughton y Hardy, 1934; Robinson y Balassu, 1981; Yirrell et al., 1991a). La escarificación se realizó con agujas hipodérmicas estériles raspando la superficie cutánea, procurando evitar el sangrado. Las agujas se impregnaban en las soluciones de desafío y luego con hisopos impregnados en la mismas soluciones, éstas se extendían sobre las zonas escarificadas. La escarificación se practicó, según las necesidades experimentales, en las zonas de piel naturalmente desprovistas de pelo o lana, cara interna de los muslos (ingle), axilas, base de cola. Cuando se aplicaron variables como origen del inóculo o concentración viral, se delimitaron superficies utilizando marcadores de punta de fieltro y tintas indelebiles.

4.8. PRUEBAS DE INTRADERMORREACCIÓN.

La prueba de intradermorreacción (IDR) es considerada la mejor herramienta para evaluar la condición inmune respecto

a EC (Buddle y Pulford, 1984). En todos los casos se ensayó aplicando 0.1 ml de los inóculos de prueba con jeringuilla de tuberculina, delimitando con marcador el área de aplicación, en la cara interna del muslo o en la base de la cola. El engrosamiento de la piel en el punto de inoculación, equivalente al doble del registrado en el punto en que se inoculó MEM como control y la presencia de eritema, se consideraron elementos indicativos de respuestas positivas. Las lecturas se realizaron 48 horas PI.

5. EXPERIMENTO 1 INMUNIDAD PERINATAL A EC EN CAPRINOS.

Considerando que no existe información en la literatura en torno a la respuesta de cabritos al desafío con EC y sobre la existencia o ausencia, de protección calostrual en la especie (punto 1.2.7.) y que observaciones personales, así como información de campo de colegas consultados, indicaban que la enfermedad raramente se presentaba en cabritos antes de los 2-3 meses de edad, se realizó el siguiente ensayo, con el objetivo de evaluar la susceptibilidad de los cabritos a la infección experimental e intentar establecer la posible existencia de protección calostrual en la especie.

5.1. MATERIAL Y MÉTODOS.

El trabajo se realizó en el rebaño del módulo caprino de la FES-Cuautitlán, compuesto al inicio del mismo, por 60 cabras

de cruza nubia, con antecedentes de haber padecido brotes de EC en los últimos años, que iban a parir entre los meses de diciembre y mayo, pues no existía un adecuado control reproductivo y en el rebaño se contaban varias hembras viejas que no se habían podido deshechar. Esta situación determinó que el trabajo se realizara por etapas para intentar cubrir los objetivos propuestos.

Al inicio del trabajo se realizó el examen clínico del hato, constatándose en los labios de 5 animales adultos formaciones papilomatosas de 0.3-0.5 cm de diámetro; algunas de estas estructuras se extirparon, se maceraron y se trataron para observación en tinción negativa, tal como se describió en el punto 4.3.

Al inicio del experimento ya habían parido algunas cabras y se disponía de un grupo de 10 cabritos con edades fluctuantes entre los 22 y 30 días, este primer grupo de cabritos fueron desafiados por escarificación con virus virulento, en la base de la cola. Como virus de desafío se empleó la cepa de referencia de origen caprino que se conservaba liofilizada (punto 4.2.). La respuesta al desafío se evaluó en los siguientes 10 días PI. El siguiente grupo de 12 cabritos que nació dos semanas después, no fue tratado y se mantuvo como control del primero. Once cabras adultas, madres de estos cabritos y 10 cabras primerizas gestantes de 3-4 meses fueron escarificadas con la misma cepa de referencia, como una forma de evaluar su condición inmune y simultáneamente reforzar en su caso, la posible protección

calostrales, 15 cabras adultas permanecieron como control sin escarificar. Las cabras primerizas fueron escarificadas nuevamente dos meses después, entre 5 y 20 días antes del parto. Los cabritos, hijos de estas cabras primerizas, formaron un tercer grupo que fue desafiado en forma semejante al primero, el desarrollo de estos eventos se describe en el cuadro 1.

Los cabritos que no desarrollaron lesiones características en la zona de escarificación, se consideraron negativos al desafío, y fueron nuevamente tratados entre los 10 y 30 días siguientes a su primer desafío, de esta manera se tuvieron diferentes grupos de edades al desafío: 3-20 días, 21-37 días y 57-65 días; todos los animales fueron por lo menos desafiados dos veces y a tres cabritos se les aplicaron tres tratamientos de escarificación.

De 8 de las hembras paridas, se colectó calostro dentro de las 12 horas posteriores al parto. El calostro obtenido fue tratado con renina, 2 mg/10 ml calostro a 37°C por 24 horas para inducir la coagulación ("cuajada") y poder separar los sólidos del suero calostrales mediante filtración con gasa. El suero fue luego centrifugado 1200 xg para eliminar la grasa excedente y estar en condiciones de emplearlo en pruebas de IDD y CIE, para evaluar la presencia de anticuerpos calostrales. Dos de las 8 hembras habían sido escarificadas previo al parto y una tercera había presentado las lesiones papilomatosas; las otras cinco no tenían antecedentes

conocidos de lesiones experimentales o naturales de la enfermedad.

De 5 hembras gestantes y 5 cabritos sin lesiones, se colectó sangre y se obtuvo el suero para ser evaluado en CIE e IDD, contra diluciones 1:2, 1:5, y 1:10 del antígeno crudo obtenido de maceración y centrifugación de costras (punto 4.4.).

Cuadro 1 Se describe la sucesión de eventos experimentales y de brote natural ocurridos en el rebaño caprino, durante los experimentos 1 y 2, considerando como día 1 el inicio de actividades con el mismo.

Día 1	Se inspeccionó el rebaño y se observaron lesiones papilomatosas en 5 cabras adultas. En tinción negativa de las biopsias de los papilomas, se demostraron partículas de parapoxvirus y papillomavirus.
Día 7	Se desafiaron por escarificación 10 cabritos de entre 22 y 30 días de edad, todos resultaron negativos (sin lesión).
Día 18-24	Nacen 12 cabritos que no son tratados, se mantienen como controles.
Día 32	Se desafian por escarificación 11 hembras adultas ya paridas y 10 primerizas de 3-4 meses de gestación. Solo dos hembras desarrollan lesiones leves, una primeriza y una adulta.
Día 43	Se destetan los 22 cabritos (días 7 y 18). Se desafian por segunda vez los cabritos del día 7, 57-65 días de edad, 8 de 10 desarrollan lesiones de EC.
Día 50	Las cabras adultas destetadas y en ordeño manual, presentan lesiones en pezones y ubres de EC en forma natural.
Día 56-66	Se colecta calostro de 8 cabras recién paridas.
Día 76	Se inicia un nuevo brote, o una segunda fase del brote de EC con lesiones faciales y orales en los cabritos de los días 7 y 18 y afecta además a los machos y a tres de las cabras ahora facialmente.
Día 93	Se escarifican por segunda vez las cabras primerizas del día 32.
Día 97-113	Paren las primerizas
Día 106	Se escarifican tres cabritos hijos de las primerizas.
Día 116	Se escarifican 7 cabritos incluidos los tres del día 106.
Día 134	Se escarifican nuevamente los 7 cabritos.

Una semana después de la última escarificación en cabritos, y asociado al destete, se presentó un brote natural de la enfermedad que se describe en el siguiente experimento. Del

brote natural y de las costras producto del desafío, se tomaron muestras que se conservaron en congelación luego de evaluarlas en tinción negativa para confirmar la presencia del virus.

5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En las lesiones de aspecto papilomatoso se pudo demostrar, en microscopía electrónica, la presencia de partículas virales características de EC y pequeñas partículas icosaédricas que se interpretaron como de papilloma virus. Estas lesiones persistieron en las cabras por más de cuatro meses.

De las 21 cabras escarificadas, 1 adulta y 1 primeriza desarrollaron lesiones calificadas como leves, delgadas costras amarillentas en las líneas de escarificación con eritema, que evolucionaron a la curación en 5 días. En la hembra primeriza las lesiones aparecieron a los 10 días posescarificación y en la adulta en los 5 días posteriores a la escarificación.

De las 8 muestras de suero calostrado 6 resultaron positivas, 1 dudosa y otra negativa en CIE; no se observaron líneas de precipitación en IDD, sugiriendo una mayor sensibilidad con CIE. La hembra con lesiones papilomatosas y las dos escarificadas pero que no desarrollaron lesiones, resultaron positivas.

De 22 escarificaciones realizadas en cabritos de menos de 30 días sólo 2 resultaron positivas con desarrollo de lesiones características y virus en las costras resultantes, en un caso fue una segunda escarificación realizada a los 21 días y la otra una tercera, realizada a los 29 días (cuadro 2). Por el contrario 3 animales escarificados después de los 30 días resultaron positivos e igualmente 9 de las 10 escarificaciones realizadas entre los 57 y los 65 días resultaron positivas. (cuadros 2 y 3, fotografía 1). Ningún cabrito, como se observa en el cuadro 2, desarrolló lesiones en la primera escarificación de desafío, realizadas todas entre los 3 y 30 días de edad en dos diferentes grupos ($p < 0.01$). Tres cabritos, uno en el primer grupo y dos en el segundo, no desarrollaron lesiones en ninguno de los dos intentos de desafío a que fueron expuestos. No se encontró relación entre las características de la respuesta al desafío, la incubación y la evolución de las lesiones posescarificación. Las lesiones se hicieron evidentes entre los 3 y 9 días y persistieron por 9-22 días. Los animales con lesiones más severas tuvieron las evoluciones más largas hasta la curación.

La condición inmune de las cabras utilizadas puede sostenerse considerando la presencia de lesiones crónicas (papilomas) en algunos animales y la resistencia de la mayoría de ellas al desafío por escarificación. La presencia de anticuerpos en el calostro además de apoyar lo anterior, sugiere la posibilidad de que esta secreción puede de alguna

manera proteger a las crías, quizás no por un mecanismo neutralizante como ha sido sugerido en ovejas (Poulain et al, 1972; Le Jan et al, 1978), pero sí por mecanismos citolíticos mediados por anticuerpos (complemento o células K). La imposibilidad de producir lesiones al desafío hasta después de los 30 días en los cabritos apoya fuertemente la idea de la existencia de alguna forma de inmunidad calostrual en los caprinos. O bien, y considerando la presencia del virus en forma natural en el rebaño, el posible establecimiento de un estado de tolerancia, quizás como consecuencia de infecciones tempranas posparto.

Es conveniente señalar que en ningún caso se presentaron respuestas exacerbadas en los desafíos de los cabritos, pese a su corta edad, 7 animales fueron escarificados entre los 3 y 11 días de edad sin consecuencias. No hubo por otra parte ningún indicio, considerando los tiempos experimentales de incubación de la enfermedad, 3-7 días (Robinson y Balassu, 1981), de que la cepa de referencia utilizada en los desafíos se transmitiera a otros animales en convivencia estrecha, con la posible excepción de la presentación de lesiones en los pezones de las cabras, 7 días después de haber sido destetados y desafiados los cabritos del primer grupo por segunda vez (cuadro 1, días 43 y 50).

Cuadro 2 Respuesta de los cabritos a la escarificación de desafío con virus de EC.

Cabrito N°	1era. escarificación		2da. escarificación		3era. escarificación	
	edad/días	respuesta	edad / días	respuesta	edad / días	respuesta
84	9	-	19	-	37	+++
85	8	-	18	-	36	+
86	8	-	18	-	36	+
81			3	-	21	+
79			5	-	23	-
82			5	-	23	-
87			11	-	29	+++
71	22	-	57	+		
70	23	-	58	+		
69	23	-	58	+		
68	24	-	59	-		
67	24	-	59	+ -		
66	24	-	59	+		
65	24	-	59	+++		
64	24	-	59	+++		
63	28	-	63	+++		
62	30	-	65	+		

- no desarrolló lesión; +- lesión dudosa; + lesión característica de EC; +++ lesión muy intensa

Cuadro 3 : Resumen de las respuestas de los cabritos al desafío por escarificación según su edad ($p < 0.01$).

Edad en días	Total de cabritos	Desafío negativo	Desafío positivo
3 a 20	10	10	0
21 a 37	17	12	5
57 a 65	10	1	9

6. EXPERIMENTO 2. SEGUIMIENTO DE UN BROTE NATURAL DE EC EN CABRAS.

Como se señaló en el experimento anterior, una semana después de la última escarificación en el primer lote de cabritos y después de que estos habían sido destetados y separados de sus madres, que comenzaron a ser ordeñadas manualmente, se inició en estas, un brote natural de la enfermedad, que incluyó a 13 de las 17 cabras en ordeña pese a su demostrada resistencia al desafío por escarificación realizado 20 días antes (cuadro 1). Estimando que el rebaño se encontraba bajo una vigilancia razonable y se conocían sus respuestas a los desafíos, se consideró de interés comunicar las observaciones del seguimiento de este brote natural; particularmente por ser escasa y contradictoria la información disponible sobre brotes de la enfermedad en caprinos.

6.1. MATERIAL Y MÉTODOS.

Se mantuvo la vigilancia sobre el rebaño caprino, inspeccionando cuidadosamente y diariamente a los animales y registrando la aparición y localización de las lesiones sospechosas de EC. De estas lesiones se colectaron costras, parte de las cuales fueron maceradas y procesadas para observación en microscopía electrónica (punto 4.3) con fines diagnósticos y el resto se conservó en congelación a -20°C , para estudios posteriores.

6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Quizás uno de los elementos más destacables en este brote fue la presencia y persistencia por 4-5 meses de lesiones papilomatosas, en 5 cabras adultas, con presencia de virus de EC, que pueden haber actuado como una importante fuente de dispersión del virus al ambiente.

El brote, con su presentación característica, se inició con lesiones que solo se presentaron en 13 de las 17 cabras en ordeño y no afectó a los animales gestantes o secos. Las lesiones se localizaron fundamentalmente en la piel de la ubre y los pezones, fueron de forma circular, de 0.3 a 1.0 cm de diámetro, de aspecto costroso y ligeramente proliferativo y se mantuvieron aisladas, no confluyentes (fotografía 2). Las costras colectadas y examinadas en microscopía electrónica evidenciaron la presencia de las partículas características de los parapoxvirus.

Cuando las lesiones de las madres se estaban ya resolviendo, ocurrieron lesiones de brote en los cabritos que tenían tres meses de edad, casi un mes de destetados, eran alimentados en cubeta y con biberón, sin contacto directo con sus madres, estos animales presentaron lesiones faciales de EC, en labios, encías y rodetes dentarios. El brote se presentó alrededor de 40 días después del desafío positivo, que había inducido lesiones posescarificación, en los animales a los 57-65 días de edad. Los animales escarificados presentaron lesiones de menor magnitud, que se resolvieron más

rápidamente que las de los cabritos que no se habían escarificado (cuadro 4). El único animal de los escarificados que desarrolló lesiones severas en el brote coincidentemente, no había desarrollado lesiones en el desafío (cuadro 4). Un cabrito huérfano, del que se desconoce si consumió calostro, fue llevado para su atención al domicilio particular de uno de los trabajadores del módulo desde su primer día de vida y presentó la enfermedad en los mismos 90-100 días, que sus compañeros de parición. En este mismo período tres cabras adultas presentaron lesiones en labios y encías, una de carácter severo y las otras dos leves, estas últimas habían presentado lesiones en los pezones el mes anterior.

Alrededor de tres semanas después de iniciado el brote en los cabritos, se presentaron lesiones faciales severas en los 6 machos del módulo que estaban alojados en corraletas separadas, junto a los ovinos de la unidad. No se observaron lesiones de la enfermedad en los ovinos, ni corderos ni adultos, pese a estar separados de las cabras por sólo un pasillo de 3-4 metros y de los machos enfermos por una malla de alambre.

Quizás la observación clínica de mayor interés, confirmada después en ovinos y caprinos, fue la de que las lesiones en pezones no son consecuencia de la lactación por crías con lesiones faciales, como se postula en la literatura consultada (Buddle y Pulford 1984; Coates y Hoff, 1990), y que por el contrario, sería factible la transmisión en

sentido inverso, desde la ubre a la boca de la cría lactante y se puede hipotetizar que la inmunodepresión del parto y la lactancia, pueden ser factores de importancia en la presentación de lesiones mamarias. Considerando que no se ha podido demostrar viremia en EC (Hussain y Burger, 1989), la transmisión por calostro o leche se considera poco probable. Pese a que las hembras y los cabritos se encontraban inmunes considerando la evidencia experimental de presentar lesiones crónicas, anticuerpos en el calostro y resistencia al desafío o en su caso el desarrollo de lesiones a la escarificación que deberían haberlos inmunizado, el brote natural se presentó dentro de los 2-3 meses en que se habían demostrado estas condiciones, sugiriendo la fragilidad de la inmunidad a la enfermedad o la existencia de variantes del virus (Buddle et al. 1984 B; Mahuel y Munz, 1987).

La observación de un cuadro más benévolo en los cabritos escarificados contra los controles no desafiados, apoya la conveniencia de esta práctica, como alternativa profiláctica aunque no logre evitar la presentación de lesiones, (Wachendörfer y Valder, 1980; Mahnel y Munz 1987; Buddle y Pulford, 1984).

Cuadro 4: Respuesta de los cabritos en la escarificación de desafío y presencia, gravedad y duración de las lesiones en el brote natural de EC.

Cabrito N°	Escarificación		Presencia de lesiones en el brote natural		
	Edad / días	Respuesta	Edad / días	Lesión	duración / días
62b	65	+	100	+	23
63b	63	+++	98	+	5
64b	59	+++	94	+-	23
65b	59	+++	94	+	21
66b	59	+	94	+-	5
67b	59	+-	94	++	9
68b	59	-	94	+++	12
69b	58	+	93	+-	21
70b	58	+	93	+	21
71b	57	+	92	+	5
68r	S/E	S/E	55	++	9
69r	S/E	S/E	55	+	9
71r	S/E	S/E	54	++	28
72r	S/E	S/E	53	+	9
73b	S/E	S/E	58	+++	28
74b	S/E	S/E	59	++	9
75b	S/E	S/E	59	++	28
76b	S/E	S/E	58	+++	28
77b	S/E	S/E	58	-	
78b	S/E	S/E	58	+	9
79b	S/E	S/E	56	+	9
80b	S/E	S/E	55	+	9

S/E, animales controles que no fueron escarificados; - no hubo lesión natural o al desafío; +- lesión leve natural o al desafío; + lesión clara de EC; ++ lesión intensa; +++ lesión muy intensa.

Las lesiones en las ubres de las cabras pudieron ser consecuencia de la mayor descamación y actividad metabólica del epitelio, asociado a la ordeña manual o a efectos traumáticos por la misma, aunque esto último es menos probable en la ordeña manual. Igualmente es necesario considerar la transmisión de la enfermedad por las manos de

los operadores o utensilios empleados en el trabajo, pero es difícil entender el tiempo transcurrido entre la presentación de lesiones en las madres y sus crías.

Si se observa la secuencia temporal de los eventos experimentales y de brote natural (cuadro 1), solamente la segunda escarificación del primer lote de cabritos y la presentación de lesiones en los pezones de sus madres, caen dentro de los tiempos estimados de incubación por inoculación experimental directa, 3-7 días (Robinson y Balassu, 1981; Tórtora, 1985).

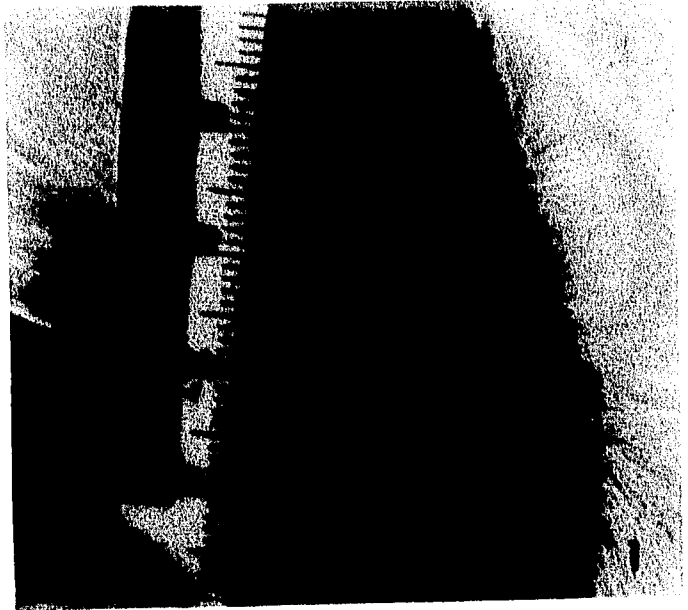
Es particularmente llamativa la presentación del brote en dos fases, afectando primero a las cabras en los pezones y luego a los cabritos, los machos del rebaño e incluso nuevamente a tres de las cabras, con lesiones faciales y orales. Sugiriendo la posibilidad de que dos diferentes cepas del virus, actuaran en cada fase y que incluso fueron diferentes a la cepa de referencia empleada en los desafíos experimentales.

Recientemente empleando IDD, CIE y electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), se evaluaron algunas de las características antigénicas de los virus de EC recuperados de las costras de los brotes de este experimento y se compararon entre sí y con el virus de referencia empleado en los desafíos experimentales realizados en el módulo de ovinos y en el de caprinos de la FES-C (González, 1992).

De las 7 muestras evaluadas (6 caprinas y 1 ovina), en IDD y CIE contra el suero hiperinmune de conejo obtenido contra la

muestra de referencia (puntos 4.4, 4.5. y 4.6.), seis mostraron bandas de precipitación con respuesta de identidad con la muestra del inóculo de desafío, cepa de referencia homóloga para el suero hiperinmune empleado y una de ellas, proveniente de las costras de los pezones de las cabras, mostró dos líneas de precipitación de identidad con la muestra de referencia . En cambio, una muestra obtenida de lesiones faciales de los cabritos, no formó líneas de precipitación ni en IDD ni en CIE.

En PAGE se constataron dos antígenos comunes a 4 de las muestras evaluadas por esta técnica, incluida la muestra que no había formado líneas de precipitación en IDD y CIE, con variaciones en los componentes antigénicos con pesos moleculares entre 31 y 45 Kd (cuadro 5), que se encuentran entre los pesos de los atribuidos al filamento superficial y que son considerados de gran importancia en los mecanismos de reconocimiento inmune del virus (Buddle et al., 1984; McKeever et al., 1987) e incluso de las posibles fallas vacunales o de pérdida de resistencia a la enfermedad. La inmunotransferencia en PAGE, con el suero hiperinmune de conejo reconoció los péptidos de: 63, 55, 54, 53, 51, 50, 48, 39, 36, 30 y 25Kd (González, 1992), por lo que la falta de respuesta en IDD y CIE en la muestra facial de cabra, puede atribuirse a baja concentración antigénica para estas pruebas o a la ausencia del péptido de 39KD.

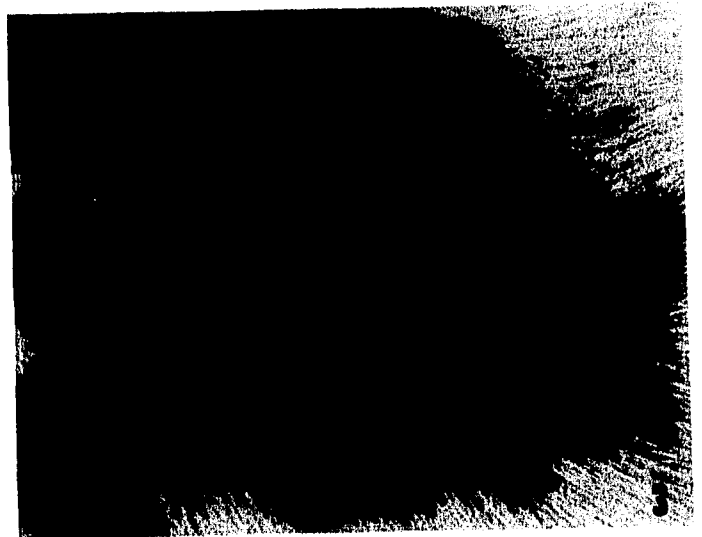


FOTOGRAFIA 1: Respuesta positiva a la es-
carificación con virus de EC, en la base
de la cola de un cabrito,



FOTOGRAFIA 2: Lesión de EC en el pezón
de una cabra.

FOTOGRAFIA 3: Respuestas de un cabrito a
los distintos inóculos de EC y parapox bo
vinos, aplicados intradérmicamente en la
cara interna del muslo.



Cuadro 5: Líneas de precipitación electroforética obtenidas en PAGE, de los parapoxvirus caprinos, ovinos y bovinos, en los distintos brotes que se presentaron en la Unidad Académica de Enseñanza Agropecuaria de la FES-Cuautitlan UNAM. Los pesos moleculares estimados se expresan en Kd (González, 1992).

EC de referencia cabra BCS 1980	Cabritos facial Exp.2 1985	Cabrito facial Exp.6 1988*	Ovino facial brote 1988.	PVB brote 1986	EPB brote 1986
55	55	55	55	55	55
48	48			48	
45	45				
		42	42		
39					
38					
35		35	35		
					33
31	31				
				30	
		25	25		
22					
		21			
17	17		17	17	17
15		15			
9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5

* Muestra que no formó líneas de precipitación en IDD.

Estos resultados refuerzan las conclusiones anotadas, en cuanto a que el virus de referencia si tiene relaciones antigénicas con los que determinaron las lesiones de brote, estas relaciones fueron suficientes para proteger a los animales de desarrollar lesiones severas y que solo se

presentaran lesiones leves y de menor duración. Sin embargo, las variaciones detectadas en PAGE, atribuibles a diferencias en el filamento de superficie entre el virus de referencia y los de brote, permiten comprender la presencia de lesiones, aunque leves, en animales que, por sus respuestas al desafío con el virus de referencia se presentaron como resistentes a la enfermedad y explicar incluso, el comportamiento aparentemente bifásico del brote, considerando que hubieron diferencias entre las muestras de pezones y las faciales, reforzando así lo apuntado por otros autores respecto a la importancia de los componentes antigénicos de los filamentos de superficie en la respuesta inmune a EC (Buddle et al., 1984; McKeever et al., 1987). Finalmente y como ha sido observado en otras ocasiones, los ovinos instalados en la proximidad de las cabras, no fueron afectados por el brote; ni siquiera los corderos, considerados más susceptibles (Tórtora, 1985).

7. EXPERIMENTO 3. INACTIVACIÓN POR CALOR DEL VIRUS DEL ECTIMA CONTAGIOSO.

La dificultad de evaluar la respuesta inmune de los animales expuestos al virus de EC, por pruebas serológicas ha sido señalada por diversos autores, así como existe evidencia de que los anticuerpos no parecen ser protectores (McKeever et al., 1987). En cambio, se ha señalado, la posibilidad de emplear el virus de EC inactivado por calor como antígeno en

pruebas de intradermorreacción con mejores resultados en cuanto a la apreciación de la condición inmune de los animales (Buddle y Pulford, 1984). Sin embargo, distintos autores han señalado variaciones en los rangos de 50 a 65°C, como temperaturas límite de inactivación a diferentes tiempos (Boughton y Hardy, 1934; Buddle et al., 1984 b; Sawhney, 1972; Trueblood y Chow, 1963), parte de las variaciones observadas pueden atribuirse a los sistemas sensibles empleados para verificar la inactivación, fundamentalmente animales y cultivos celulares. Existe por otra parte, suficiente evidencia indicativa de que el cambio de morfología de partículas de tipo 1 o M (ovillo de estambre, infectantes) a las de tipo 2 o C (claras o permeables, no infectantes) es indicador de alteración del virus y de pérdida de la condición de infección (Mitchiner, 1969; Nagington et al., 1964; Robinson et al., 1982) (ultrafotografías 4 y 5). Por lo anterior se realizó este ensayo con el objetivo de evaluar el efecto de la temperatura sobre el virus, en función de los cambios de estructura de las partículas virales observadas con tinción negativa en el microscopio electrónico y así eludir el uso de cultivos celulares, dado el comportamiento errático del virus en los mismos (punto 1.1.4.).

7.1. MATERIAL Y MÉTODOS.

En la evaluación se empleó la muestra de referencia de origen caprino que se conserva en liofilización y de la que

se conocen buena parte de sus cualidades, entre otras, la de presentar una alta concentración de partículas. Se calibró la estufa a diferentes temperaturas 50°C, 55°C y 60°C, para realizar respectivamente tres evaluaciones a diferentes tiempos de exposición al calor: 15, 30, 45 y 60 minutos, colocando alícuotas de la muestra (0.5 ml) que se retiraron de la estufa a los tiempos señalados y se enfriaron en agua con hielo. Una vez detenida la exposición al calor, se procesaba la muestra para la observación en microscopio electrónico por tinción negativa. Una muestra del liofilizado recién reconstituido, se procesó de la misma forma como control de tiempo 0. Dos operadores, en forma independiente, contaron el número de partículas de tipo 1 y 2 sobre un total aproximado a 50 partículas por muestra, este número de partículas se estimó previamente como suficiente para el modelo estadístico a emplear y en general se lograba al contar las partículas de dos cuadros. Los valores obtenidos se analizaron en una regresión lineal y se ajustaron a un modelo lineal con transformación logarítmica.

7.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados se resumen en el cuadro 6. Se puede observar que en las muestras calentadas a 50°C por 1 hora, prácticamente se reduce a la mitad la relación de partículas de tipo 1 sobre las de tipo 2. En el mismo tiempo la muestra

calentada a 55°C reduce más de 10 veces esta relación y a 60°C casi 16 veces. A 60°C la caída en el número de partículas 1 es ya muy marcada a los 15 minutos, de 86 a 15 en números absolutos, puede también observarse que en las muestras calentadas a 60°C fue más difícil el conteo de partículas totales, comparado con las exposiciones a 50 y 55°C.

Cuadro 6: Número de partículas de tipo 1 o M (1M) y 2 o C (2C), en la muestra de EC de referencia calentada a 50, 55 y 60°C a los 15, 30, 45 y 60 minutos de tratamiento, según dos observadores, en microscopía electrónica.

Temp. °C	Tiempo minutos	Observador 1		Observador 2		Total		Relación 1M/2C
		1M	2C	1M	2C	1M	2C	
20	0	48	15	38	19	86	34	2,53
50	15	40	10	36	22	76	32	2,37
50	30	36	12	54	22	90	34	2,64
50	45	34	16	42	31	76	47	1,62
50	60	27	20	28	24	55	44	1,25
55	15	49	19	35	24	84	43	1,93
55	30	27	31	39	15	66	43	1,45
55	45	20	16	1	40	21	56	0,38
55	60	11	44	10	49	21	93	0,22
60	15	4	18	11	22	15	40	0,37
60	30	5	35	8	27	13	62	0,21
60	45	5	18	9	44	14	62	0,22
60	60	5	38	8	45	13	83	0,16

El análisis del cuadro 6 pone en evidencia además, fuertes variaciones en las anotaciones de los dos observadores, con una mayor tendencia del observador 1 a diagnosticar partículas de tipo 1 o M. Aunque este efecto fue considerado por el modelo estadístico, no debe dejar de tenerse en cuenta, que si bien se obviaron los problemas del comportamiento del virus en los cultivos celulares, el procedimiento empleado incorpora las variaciones introducidas por la interpretación de los observadores. Las diferencias de diagnóstico entre los mismos, son atribuibles a la presencia de partículas con grado variable de alteración entre las formas claramente de tipo 1 o 2, que fueron anotadas en forma distinta por cada observador.

En la figura 1 se observan los resultados ajustados al modelo lineal y puede notarse que los valores calculados para el tiempo 0 de exposición en los tres casos, son muy próximos al de la observación directa en el microscopio, de hecho, con la excepción del gráfico de valores para 50°C., las curvas ajustadas para 55° y 60°C tuvieron un alto coeficiente de determinación, 50°C $r^2 = -0.61$, 55°C $r^2 = 0.88$ y 60°C $r^2 = 0.97$.

De acuerdo a los resultados, el virus se inactivaría a 60°C en una hora, mientras que en igual tiempo a 55°C tendría cierto poder infectante, que sería mayor aún a 50°C. Estos resultados coinciden con observaciones de otros autores que emplearon cultivos celulares como sistema sensible para evaluar el efecto de la temperatura (Sawhney, 1972;

Trueblood y Chow, 1963; Buddle et al., 1984), con el beneficio de que se elude el comportamiento errático del virus en los cultivos (Nagington et al., 1965; Nagington, 1968; Zebrowski et al., 1974; Tórtora, 1985).

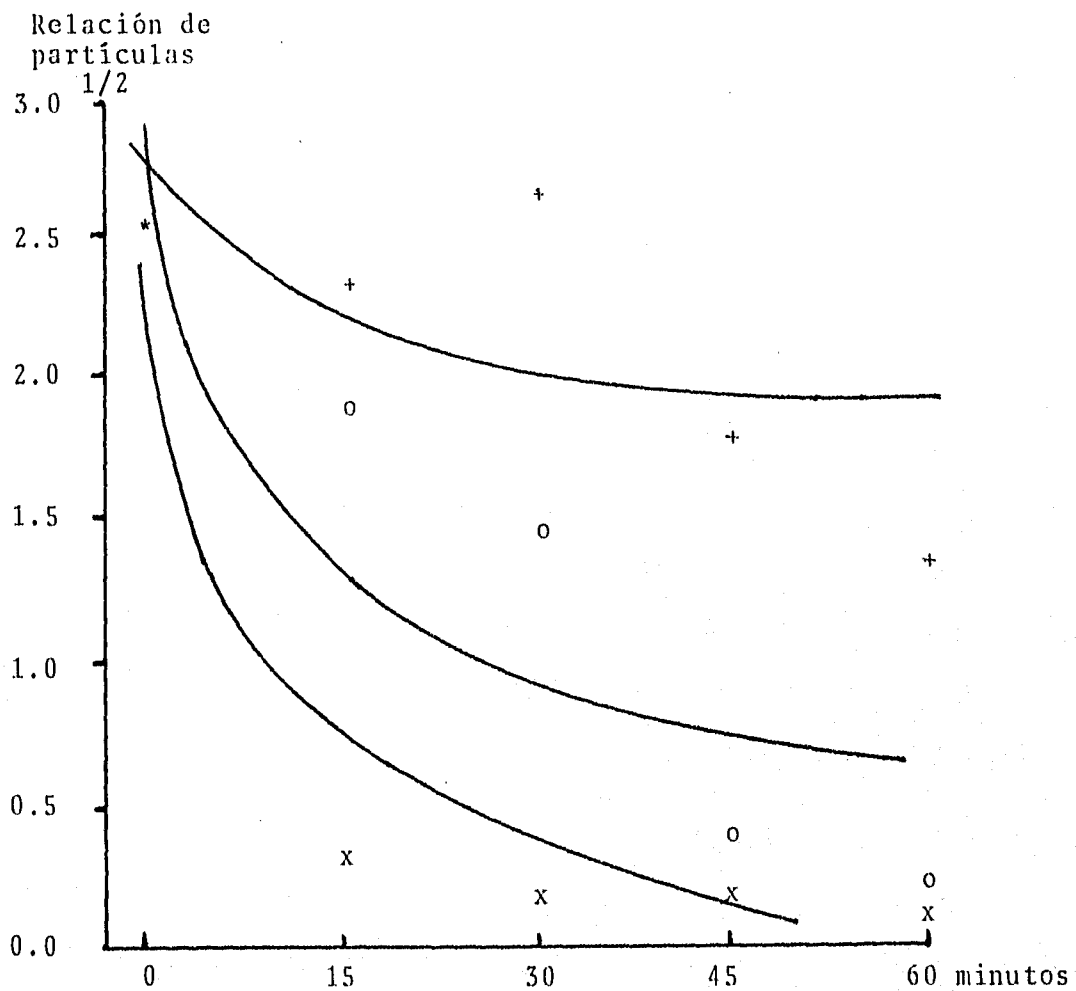
8. EXPERIMENTO 4. EVALUACIÓN DE DIFERENTES ANTÍGENOS EN INTRADERMORREACCIÓN.

A los efectos de poder contar con una alternativa de evaluación de la condición inmune de los animales en experimentación, se ensayaron diferentes presentaciones del antígeno en pruebas de intradermorreacción (IDR), posibilidad que aparece citada como comunicación personal de Fastier y como recomendación segura de uso, en la evaluación inmune de EC, en la revisión de Robinson y Balassu (1981) y que sólo ha sido refrendada experimentalmente en el trabajo de Buddle y Pulford (1984), empleando virus inactivado por calor 1 hora a 65°C.

8.1. MATERIAL Y MÉTODOS.

Se empleó en el ensayo el virus de EC de origen caprino que se conserva liofilizado como muestra de referencia y una muestra de pseudoviruela (PVB) obtenida de bovinos de la unidad de FES-C, verificada por tinción negativa en microscopio electrónico (Tórtora, 1987).

FIGURA 1 : Variación en la relación de partículas 1(M) y 2(C), en muestras de ectima contagioso calentadas por una hora a 50, 55 y 60°C; valores ajustados a una ecuación lineal y valores obtenidos en la observación directa. Las muestras se evaluaron a los 15, 30, 45 y 60 minutos, en los tres tratamientos térmicos.



Valores de observación:

* Muestra de origen a 20°C

+ 50°C $r^2 = -0.61$

o 55°C $r^2 = -0.88$

x 60°C $r^2 = -0.97$

Ambos virus fueron inactivados por calor mediante permanencia en estufa a 70°C por una hora. El virus de EC fue además ensayado inactivado por formalina a concentración final de 0.01% y por exposición a luz ultravioleta (UV), colocando la suspensión viral en cajas de plástico abiertas a 7.5 cm. de distancia de una lámpara de UV de 1.5 volts por 72 horas, en una campana de seguridad. Como controles se aplicó una solución de formalina 0.01% y MEM sin suero, empleado para resuspender el virus liofilizado y macerar las costras de PVB. En dos puntos más se aplicaron los virus de EC y PVB virulentos, sin tratar. Los inóculos fueron evaluados por tinción negativa en el caso de la inactivación con UV y formalina.

Para aplicar los inóculos, en la cara interna del muslo izquierdo, se trazó con marcador una cuadrícula con los ocho espacios ordenados como se señala en la figura 2, colocando en cada cuadro un inóculo por vía intradérmica en cantidad de 0.1 ml, con jeringuilla de tuberculina. Se emplearon en la prueba 3 corderos de 6 meses de edad y 8 cabritos entre los 3 y 9 meses de edad. Entre los cabritos se encontraban 5 animales que habían sido escarificados en el experimento 1. Dos, que habían sido controles no escarificados. Los 7 habían estado presentes en el brote natural descrito en el experimento 2. Un cabrito nació después del brote y no había tenido cuadro clínico de EC.

Figura 2 : Cuadrícula que describe la forma en que se distribuyeron los puntos en que se inocularon intradermicamente las distintas presentaciones antigénicas.

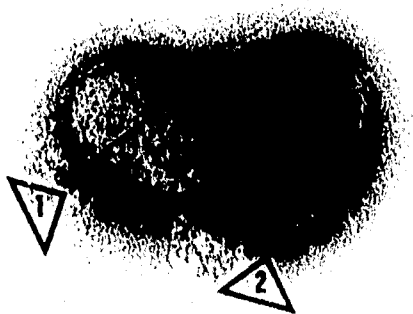
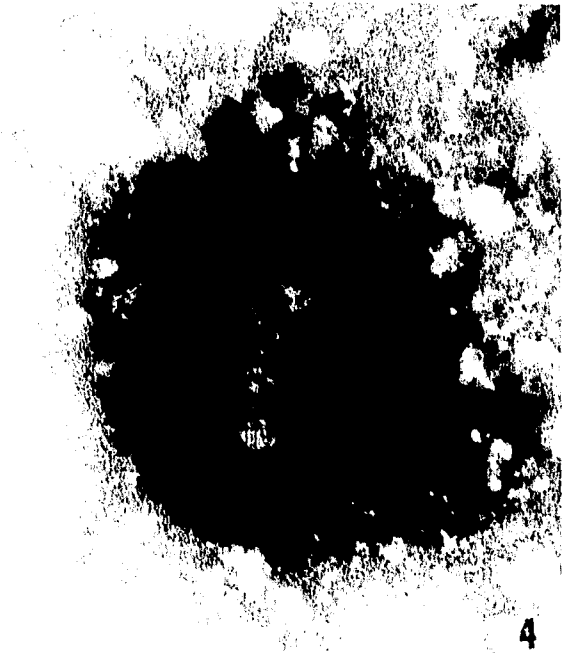
EC + formol 0.01%		formol 0.01%
PVB virulento		PVB + calor
EC virulento		EC + calor
Control MEM		EC + ultravioleta

Los animales se examinaron diariamente durante la semana que siguió a la inoculación, midiéndose el espesor de la piel y el diámetro de la zona externa en la zona de inoculación a las 48 horas PI (fotografía 3).

8.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

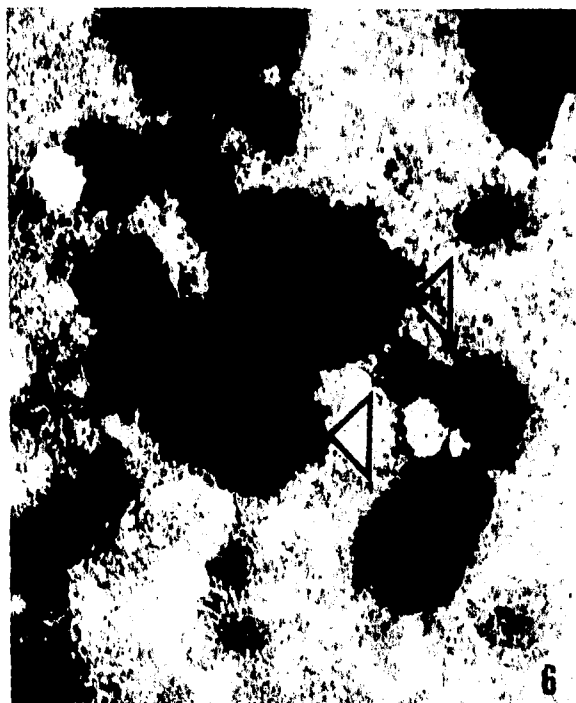
El examen de los inóculos de EC inactivados por UV y formalina al 0.01% en tinción negativa, no permitió la observación de partículas virales de tipo 1 o 2. En cambio, se observaron estructuras de morfología y tamaño semejante al virus. Las estructuras se presentaron como siluetas completamente permeables al fosfotungstato, en las que no se observaba ninguna estructura viral ni interna, ni externa (ultrafotografía 6). El número de estas estructuras fue considerablemente menor que el de partículas virales en los inóculos originales no tratados. Estas "siluetas" fueron interpretadas como partículas virales extremadamente deterioradas y es posible que buena parte de las partículas se hayan disgregado en las suspensiones tratadas.

FOTOGRAFIA 4: Partícula viral de tipo 1 o M, característica de los parapoxvirus. El filamento superficial enrollado regularmente le da el aspecto de ovillo de estambre. Fosfotungstato de sodio pH 7.4, 285.000x.



FOTOGRAFIA 5: Partículas virales de tipo 1(M) y 2(C) características de los parapoxvirus, las partículas 2 permeables al fosfotungstato, permiten apreciar las cubiertas del virus y el nucleoide. Fosfotungstato de sodio pH 7.4, 263,000x.

FOTOGRAFIA 6: Partículas virales de tipo 2(C) (flechas), severamente dañadas, se presentan redondeadas, hinchadas y no se distinguen las estructuras de cubierta. Fosfotungstato de sodio pH 7.4, 343,000x.



En el cuadro 7 se resumen los resultados de la prueba en cada animal. Para considerar positiva la reacción se aplicó el criterio establecido por Buddle y Pulford (1984), de dar positivos los puntos en que ocurría un aumento del doble en el espesor de la piel, considerando además el diámetro del eritema a los 48 horas PI (fotografía 3).

En los puntos en que se inoculó MEM y EC inactivado con UV no ocurrió ningún cambio.

En el caso del virus inactivado con formalina sólo 2 cabritos presentaron reacción positiva, que en uno duró hasta el día 7 y dos cabritos dieron respuesta dudosa (\pm) considerando la presencia de eritema y en un caso el ligero incremento en el espesor de la piel. En el control de formalina 0.01%, tres cabritos y un cordero desarrollaron en el punto de inoculación respuestas semejantes a las calificadas como dudosas (\pm) y un cabrito desarrolló una de tipo positivo. La reacción a la formalina perduró en dos animales hasta los 7 días.

Con el EC inactivado por calor, 4 cabritos resultaron positivos y uno dudoso. Con PVB inactivado por calor, 4 cabritos resultaron dudosos, coincidiendo con los positivos a EC.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Cuadro 7: Resultados de la evaluación intradérmica de diferentes presentaciones antigénicas de los parapoxvirus en cabritos y corderos, considerando las modificaciones en el espesor de la piel y el diámetro del eritema.

Cabrito N°	Control MEM	EC + formol			Formol 0.01%			EC + calor			PVB + calor			EC activo	PVB activo
	Esp. piel	Esp	Diam	Lect	Esp	Diam	Lec	Esp	Diam	Lect	Esp	Diam	Lect	Lesión	Lesión
64	1.8	1.8	9.0	d	3.5	-	+	3.8	9.0	+	1.8	5.0	d	-	+
69	1.5	2.0	8.0	d	1.5	-	-	4.0	12.0	+	1.8	6.0	d	+	+
74	2.0	2.0	-	-	2.0	10.0	d	2.0	6.0	d	2.0	-	-	-	d
84	1.5	4.0	-	+	1.5	13.0	d	3.5	8.0	+	1.5	8.0	d	+	-
86	1.0	1.0	-	-	1.5	4.0	d	2.5	10.0	+	1.5	8.0	+	+	+
85	1.0	2.0	-	+	1.0	5.0	d	1.0	-	-	1.0	-	-	-	-
87	1.3	1.3	-	-	2.0	10.0	d	1.3	-	-	1.3	-	-	-	-
88	1.8	1.8	-	-	2.5	-	-	1.8	-	-	1.8	-	-	-	-
Cordero N°															
504	1.0	1.0	-	-	1.5	-	-	1.0	-	-	1.0	-	-	+	+
506	1.5	1.5	-	-	1.5	10.0	d	1.5	-	-	1.5	4.0	-	+	+
513	1.0	1.0	-	-	1.0	-	-	1.0	-	-	1.0	-	-	+	+

MEM, solución de medio esencial mínimo con antibióticos y sin suero; EC, ectima contagioso; PVB, pseudo viruela bovina; Esp., espesor de la piel en mm en el punto de reacción; Diam, diámetro del eritema en mm en el punto de reacción; Lect., interpretación de la respuesta a IDR con cada antígeno; Lesión, desarrollo de la lesión típica o no, al inocular los virus virulentos (activos) por vía intradérmica. (+), respuesta positiva; (-), negativa; (d), dudosa.

Los tres corderos y dos cabritos reaccionaron en forma positiva con EC virulento; dos de los corderos y tres cabritos lo hicieron a PVB; un cabrito resultó dudoso. Las reacciones perduraron en estos casos hasta 7 días en 6 cabritos; tres a EC y tres a PVB, lo que sugiere más una respuesta de infección que de hipersensibilidad.

El cuadro 8 resume los resultados de las respuestas de animales con y sin lesiones de EC (experimentales o naturales) a la prueba intradérmica con los virus inactivados por calor y a los virus virulentos. Los corderos dieron respuestas explicables en animales que pese a estar expuestos no habían presentado lesiones de la enfermedad, resultaron negativos a la prueba con virus inactivado y desarrollaron lesión a los virus virulentos, las respuestas parecen coherentes con animales no inmunes a la enfermedad. En cabritos en cambio, los resultados no son relacionables y los tres últimos animales (85, 87, 88) aparecen como anérgicos, sin que se puedan explicar las respuestas.

Los resultados de esta primera prueba indican como más adecuado el uso de virus inactivado por calor para pruebas de IDR, considerando la menor respuesta en el caso de la inactivación por formalina y la presencia de reacciones inespecíficas evidenciables por el control de solución de formalina 0.01%. La inactivación por UV dio resultados negativos en todos los casos. Es posible que el grave deterioro de las partículas virales e incluso la pérdida de partículas, haya influido la ausencia o la pobre respuesta a

estos antígenos, sugiriendo que cierta integridad de las partículas es necesaria para el reconocimiento antigénico, parecería

que las partículas de tipo 2 no infectantes son una adecuada presentación; los resultados coinciden con la propuesta de Buddle y Pulford, (1984).

Cuadro 8: Respuesta de cabritos y corderos a la intradermorreacción, considerando su exposición al virus por desafío o brote natural, o bien la ausencia de la misma.

Cabrito	Desafío	Brote	EC+calor	PVB+calor	EC virulento	PVB virulento
64	+	+-	+	d	-	+
69r	S/D	+-	+	d	+	+
74	S/D	++	d	-	-	+
84	+++	N/E	+	d	+	-
86	+	N/E	+	-	+	+
85	+	N/E	-	-	-	-
87	+++	N/E	-	-	-	-
88	S/D	N/E	-	-	-	-
<hr/> Cordero <hr/>						
504	S/D	-	-	-	+	+
506	S/D	-	-	-	+	+
513	S/D	-	-	-	+	-

S/D, animales no desafiados; N/E, animales no expuestos al brote natural; +-, lesión dudosa; +, lesión característica; ++ lesión intensa; +++, lesión muy severa; - no presentó lesión o respuesta; d, lesión dudosa.

La respuesta a PVB inactivado por calor, coincidente con la de EC pero de menor intensidad, indica la existencia de una

importante relación antigénica entre estos virus. La respuesta de cabritos y corderos a las formas virulentas de estos virus, indica igualmente dada su fuerte coincidencia, una estrecha relación en su patogenicidad y en su interacción con la respuesta inmune de los animales desafiados, soportando la idea de que en los parapoxvirus puede considerarse un sólo virus y no tres especies (Gassman et al., 1985).

La muestra de PVB empleada en el ensayo evidenció dos líneas de precipitación, con respuesta de identidad con las muestras de ectima particularmente el liofilizado de referencia, al ser enfrentada con el suero hiperinmune de conejo contra EC. La corrida electroforética de esta muestra, evidenció en la inmunotransferencia con el suero de conejo, dos proteínas de 54 y 55 Kd, también presentes en el liofilizado empleado en las escarificaciones (González et al., 1991). Los resultados *in vitro* y las respuestas en los animales desafiados apoyan fuertemente la estrecha relación entre las muestras caprinas y las bovinas, coincidiendo con reportes anteriores (Huck, 1966; Papadopoulos et al., 1968).

9. EXPERIMENTO 5. ENSAYOS DE CAMPO DE LA IDR, CON VIRUS INACTIVADO POR CALOR

Vistos los resultados favorables obtenidos en las pruebas de IDR con el virus calentado a 70°C y considerando el escaso número de animales empleados, se decidió realizar este ensayo, con el objetivo particular de incrementar el número

de observaciones, en rebaños con antecedentes de haber padecido la enfermedad o haber estado expuestos a la misma. Adicionalmente se utilizó el experimento para evaluar la IDR a 48 y 72 hrs. PI, intentar caracterizar histológicamente la respuesta en el punto de inoculación y evaluar los resultados de emplear diluciones del inóculo.

9.1. MATERIAL Y MÉTODOS.

Se empleó el rebaño caprino de la FES-C que 8 meses antes había presentado el brote descrito en el experimento 2 y el rebaño ovino de la misma unidad de producción que como se señaló, había estado expuesto a la enfermedad pero no había presentado lesiones de EC en los últimos 5 años, pese a su vecindad estrecha con las cabras afectadas. Y tercero, el rebaño ovino de un rancho particular, a unos 20 kilómetros de la FES-C, por haber presentado un fuerte brote de EC tres años antes, con lesiones faciales en los corderos y en los pezones de las ovejas, con brotes sucesivos de menor intensidad en los años siguientes, hasta la realización de este ensayo.

En 107 hembras ovinas de 6 meses a 4 años de edad del rancho particular, se les aplicó MEM como control y EC inactivado por calor, 0.1 ml. por vía intradérmica en la cara interna del muslo. A 20 animales se les aplicaron 4 puntos intradérmicos con diluciones logarítmicas del virus inactivado (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}). En este rebaño se realizó además la prueba en 64 corderos de 3 a 5 meses, 39 de

los cuales habían sido escarificados, con fines de desafío, un mes antes con resultado positivo, como se describirá más adelante en el experimento 7.

En el rebaño caprino se evaluaron 50 animales de diferentes edades y sexo, incluidos cabritos lactantes, que no habían padecido la enfermedad, ni habían estado expuestos en el brote; un lote de animales de reciente ingreso al rebaño, provenientes de Celaya Guanajuato y de historia desconocida respecto a EC; cabritos y adultos que habían estado expuestos en el brote, habían padecido lesiones experimentales y/o naturales e incluso algunos de los animales empleados en la prueba del experimento 5. En los ovinos de la FES-C se trabajaron 30 animales de diferentes edades y sexo, incluidos los 3 animales del experimento 5.

En todos los casos los puntos de inoculación se revisaron a las 48 y 72 horas PI.

Para definir el tipo de respuesta celular de 16 animales se tomaron biopsias en los puntos de reacción positiva a la IDR en 10 de las 48 horas y en 6 de las 72 horas PI. Las muestras de biopsia se fijaron en formalina al 10% y se procesaron de rutina para obtener cortes de parafina de 6 μ de espesor que se colorearon con hematoxilina-eosina.

9.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En el cuadro 9 se resumen los resultados de la IDR en los cabritos del experimento 1 y los evaluados en el experimento 5, se puede observar que la mayoría de los animales expuestos

y desafiados resultaron positivos 10:15, un animal resultó positivo en el experimento 5 y negativo en esta prueba realizada 5 meses después.

El cuadro 10, presenta los resultados a las 48 y 72 horas PI de la IDR en caprinos y ovinos de los rebaños de la FES-C, los 17 cabritos y corderos, menores de 4 meses que no habían estado expuestos al brote de EC en las cabras resultaron negativos, mientras que en los animales de mayor edad respondieron mayoritariamente en forma positiva, 18:28 en cabras y 19:25 en ovinos. Las respuestas positivas de los ovinos son particularmente llamativas, especialmente en los animales de mayor edad (3-5 años) 15:16, considerando que en los ovinos no se habían presentado lesiones en los últimos 4 años.

Cuadro 9: Respuesta de cabritos previamente desafiados o expuestos a brotes de la enfermedad, a la prueba de IDR con virus de EC inactivado por calor.

Cabrito N°	Desafío 8/3/85	Brote EC 8/5/85	Desafío 8/5/85	IDR 8/9/85	IDR 15/2/86
62	+	+			-
63	+++	+			d
64	+++	+ -		+	-
66	+	+ -			+
67	+ -	++			+
68	+	+++			+
69b	+	+ -			+
70	+	+			d
84			+++	+	
85			+	-	
86			+	+	
87			+++	-	
88				-	
69r		+		+	
74		++		d	

+ -, lesión leve; + lesión característica de EC, o respuesta positiva a IDR; ++, lesión severa de EC; +++, lesión muy severa de EC; - respuesta negativa a IDR; d, respuesta dudosa en IDR.

Esta observación en los ovinos sugiere, que aunque no desarrollaron lesiones, la exposición al virus en el brote que afectó a las cabras, indujo una respuesta inmune demostrable con IDR. Este resultado indica la presencia de posibles portadores asintomáticos y apoya la idea de que no es suficiente la exposición al virus con animales enfermos para determinar enfermedad. Señala la posibilidad de diferente susceptibilidad de especie al virus y/o de variantes del virus con distinta capacidad para infectar y producir lesiones en ovinos y caprinos, aunque estimularan en forma independiente una respuesta inmune demostrable con IDR. La reacción en los animales de más edad parece indicar que la respuesta inmune en las ovejas puede ser de mayor magnitud y duración que en las cabras y explicar la observación frecuente de que en rebaños mixtos (ovejas y cabras) la enfermedad afecta siempre en forma más severa a las cabras que a las ovejas (Tórtora, 1985).

Cuadro 10: Respuesta a la IDR, con virus de EC calentado, en caprinos que padecieron con lesiones el brote de la enfermedad, en los cabritos que no estuvieron expuestos y en los ovinos que no presentaron lesiones pero estuvieron expuestos al mismo brote, en el módulo de la FES-Cuautitlán.

Edad de los animales	Exposición al Brote	Número animales	Lectura IDR 48 hrs.		Lectura IDR 72 hrs.	
			(+)	(-)	(+)	(-)
<u>Caprinos</u>						
15 días a 4 meses	NO	12	0	12	0	12
9 a 12 meses	SI	16	11	5	7	9
2 a 5 años	SI	12	7	5	4	8
3 a 5 años (Celaya)	sin antecedentes	10	3	7	1	9
<u>Ovinos</u>						
1 a 3 meses	NO	5	0	5	0	5
1 a 2 años	SI	9	4	5	3	6
3 a 5 años	SI	16	15	1	12	4

El análisis de las lecturas de 48 y 72 horas indica que a las 72 horas se pierden respuestas positivas 13 de 40.

El cuadro 11, presenta los resultados de IDR en los ovinos del rancho particular en donde la enfermedad se ha presentado con lesiones en los últimos 3 años anteriores al experimento, la proporción de animales positivos es muy alta 75:107, pese a que por razones propias del rancho la lectura de los animales de más de 2 años no pudo realizarse a las 48 horas y es posible que se hayan dejado de percibir respuestas positivas, tal como ocurrió en el caso del rancho de la FES-C.

El cuadro 12, muestra los resultados observados en los corderos de este mismo rancho particular, evidenciando una significativa respuesta positiva en los corderos escarificados comparada con los no tratados ($\chi^2=5.32$, $p < 0.02$), en apoyo a la especificidad de la prueba. Los animales no escarificados que resultaron positivos 8:25 no invalidan la afirmación, considerando que todos los animales estuvieron expuestos al virus de desafío y al de campo en este rancho. Lamentablemente en EC no se puede contar con animales seguramente no expuestos al virus, para estar en condiciones de realizar pruebas que den mayor confiabilidad a las estimaciones de su especificidad.

Cuadro 11: Respuesta de IDR en 107 ovinos de distintas edades, de un rebaño que había padecido brotes de EC en los últimos tres años (experimento 5).

Edad de los animales	Número de animales	Lectura IDR 48 hrs.		Lectura IDR 72 hrs.	
		(+)	(-)	(+)	(-)
6 meses a 1 año	40	34	6		
2 y 3 años	34			24	10
más de 4 años	33			17	16

Cuadro 12: Respuesta a la IDR, de corderos desafiados por escarificación, con desarrollo de lesiones y controles no tratados (no desafiados).

	Nº de corderos	IDR (+)	IDR (-)
Corderos desafiados	39	24	15
Corderos controles	25	8	17

(p < 0.02)

De los 20 animales adultos en que se ensayaron diluciones logarítmicas del antígeno, 11 resultaron negativos, 9 dieron respuesta positiva en 10^{-1} , cinco de estos en 10^{-2} y un animal respondió incluso en 10^{-3} .

El examen histológico de las biopsias obtenidas en los puntos de reacción a las 48 horas, se pudo constatar un infiltrado celular constituido principalmente por linfocitos y mononucleares, aunque se presentaron algunos acúmulos focales de neutrófilos y escasos eosinófilos; también fue constante la presencia de congestión vascular y ligero edema. En las muestras de 72 horas el componente vascular se presentó francamente disminuído y el infiltrado celular en la dermis fue claramente de mononucleares con predominio linfocitario (fotografía 7), en la subdermis se observaron

polimorfonucleares pero ahora se distinguían con mayor claridad por su número y tamaño los eosinófilos sobre los neutrófilos. Estas imágenes soportan, junto con la observación del punto de lesión y su evolución, que se trata de una respuesta de hipersensibilidad de tipo IV (Morilla,1989).

Los resultados obtenidos según la edad y los antecedentes del rebaño respecto a EC, sugieren fuertemente que la prueba es lo suficientemente sensible como para detectar animales expuestos aunque no hayan padecido alguna forma de lesión (experimental o natural), en el mismo sentido apuntan las respuestas observadas con el antígeno diluído.

El cuadro 13, muestra los resultados acumulados para ovinos y caprinos, en función de la consideración de animales expuestos a brotes de la enfermedad, independientemente de que hayan o no, presentado lesiones clínicas, sus respuestas a la IDR y la estimación de su sensibilidad y especificidad en estas condiciones; se insiste en la imposibilidad de trabajar con animales seguramente no expuestos a EC. Considerando que la condición de expuesto, no necesariamente indica que el animal se infectó y viceversa que el no haber sido expuesto a un brote, no es garantía de que no entró en contacto con el virus; los valores de sensibilidad de 67,3% y los de especificidad de 81,4%, pueden considerarse como aceptables a nivel de animal individual y como buenos si se trata de definir si un grupo de animales ha sido o no expuesto a la enfermedad.

Cuadro 13: Resultados acumulados de las pruebas de IDR en caprinos y ovinos, considerando si los animales habían o no, estado expuestos a brotes de la enfermedad y los valores resultantes de sensibilidad y especificidad en cada caso.

<u>Caprinos</u>	Nº animales	IDR (+)	IDR (-)	
Expuestos	52	32	20	Sensibilidad 61.5%
No expuestos	13	0	13	Especificidad 100%
<u>Ovinos</u>				
Expuestos	171	118	53	Sensibilidad 69%
No expuestos	30	8	22	Especificidad 73.3%
<u>ACUMULADO</u>				
Expuestos	223	150	73	Sensibilidad 67.3%
No expuestos	43	8	35	Especificidad 81.4%

La observación de que animales que habían padecido la enfermedad o habían sido escarificados con resultados positivos resultaron IDR(-), aunque se haya tratado de pocos casos, indica la ocurrencia de un número de pruebas falsas negativas que hacen poco recomendable el uso de la prueba en animales individuales y en cambio la IDR puede, a la luz de estos resultados, recomendarse ampliamente para demostrar en grupos de animales, no sólo la posibilidad de que hayan enfermado sino incluso el hecho de que sólo hayan estado expuestos en un brote.

Los falsos negativos son de difícil explicación, pero considerando la demostrada participación de fenómenos locales en la respuesta a la infección por EC (Robinson y Balassu, 1981), es posible que mecanismos de presentación y/o secuestro del antígeno pudieran ocurrir en el punto de inoculación, modificando la respuesta, de hecho no deja de ser llamativa la presencia asociada de polimorfonucleares a la hipersensibilidad tipo IV, considerando la activa

participación de neutrófilos en la respuesta al virus virulento (Jenkinson et al., 1990 a)(1.2.4.f.). Los polimorfonucleares pueden ser también consecuencia de fenómenos inflamatorios inespecíficos asociados a la respuesta o indicadores de contaminantes en el inóculo

10. EXPERIMENTO 6. RESPUESTA DE CABRITOS A LA IDR, AL DESAFÍO CON EC Y COMPORTAMIENTO EN BROTE NATURAL.

Considerando las pocas observaciones realizadas en los experimentos 1 y 2 y que estas resultaron sin embargo, en muchos sentidos novedosas, en cuanto a esclarecer la condición de la respuesta de cabritos al EC, en este ensayo se repitió básicamente el esquema seguido en el experimento 1. Pero ahora los cabritos fueron evaluados en su condición inmune, empleando simultáneamente la prueba de IDR y la escarificación de desafío. El objetivo particular de este ensayo, fue evaluar la respuesta de los cabritos al desafío experimental con el virus del EC, incrementando el número de observaciones a las realizadas en el experimento 1, al mismo tiempo, que se ensayaba la IDR a temprana edad, para intentar evaluar su condición inmune al momento del desafío.

10.1. MATERIAL Y MÉTODOS.

Nuevamente se empleó el rebaño caprino de la FES-C, ahora tres años después del experimento 1, con la parición de

noviembre 1987 marzo 1988, en los tres años transcurridos el rebaño estuvo presentando sucesivamente animales con lesiones, particularmente entre los cabritos y en algunos casos en los pezones de las madres, pero no se tomaron registros de los casos.

Tanto para las pruebas de IDR con virus inactivado por calor (1 hr/70°C), como para los desafíos por escarificación, se empleó la muestra de referencia liofilizada, reconstituída con MEM sin suero, adicionado de antibióticos (punto 4.2).

En este experimento se emplearon 47 cabritos, a 33 de estos animales entre los 10 y los 11 días de edad, se les aplicó simultáneamente 0.1 ml del antígeno inactivado por calor por vía intradérmica y un control de MEM, en la misma forma ensayada en los experimentos 4 y 5 y fueron escarificados con el mismo virus pero en su estado virulento en la cara interna del muslo opuesto, 14 cabritos se mantuvieron en el lote sin recibir ningún tratamiento. La prueba de IDR se evaluó a las 48 horas y la zona de escarificación se examinó en los siguientes 15 días PI. Las diferencias en las respuestas entre grupos se evaluaron con la prueba de chi cuadrada.

10.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Una respuesta de IDR no fue evaluada, 20 cabritos dieron respuesta positiva y 12 resultaron negativos, contra lo esperado fue más alto el número de animales positivos entre los cabritos menores de 45 días 15:19 que entre los mayores

5:13 ($p < 0.02$), incluso los 7 animales menores de 30 días fueron todos IDR(+).

Otro resultado no esperado fue que a diferencia de lo anotado en el experimento 1, 4 de 7 animales menores de 30 días respondieron positivamente a la escarificación. Las respuestas a la escarificación en este trabajo, se comportaron en forma independiente de la edad y la respuesta a la IDR de los cabritos.

Igual que en el caso de los experimentos 1 y 2, un brote de la enfermedad se presentó una semana después de la inoculación experimental, iniciando en 17 cabritos con lesiones faciales. La observación de las lesiones características de la enfermedad, ocurrió en este caso, dentro de los términos señalados para la incubación de la misma en infecciones experimentales, **a posteriori** del desafío, por lo que puede plantearse la posibilidad de que el brote fuera inducido por el inóculo empleado en el mismo. Sin embargo, nuevamente el análisis de las corridas de PAGE, evidenció ciertas diferencias entre la cepa de referencia empleada en el desafío y el virus obtenido de las costras del brote, cuadro 5 (González, 1992).

En este caso las lesiones en las hembras se presentaron posteriormente a la de los cabritos, principalmente en pezones y piel de glándula mamaria, afectando a 12 hembras paridas y en ordeña, pero también se constataron lesiones en 2 animales que aún no habían parido y en 2 que no estaban gestantes.

En forma más contundente que en el experimento 2, los cabritos que habían sido escarificados con resultado positivo desarrollando lesiones, no presentaron la enfermedad natural, sólo 4 de 17 animales presentaron lesiones en el brote en estas condiciones ($p < 0.05$), al considerar a los animales controles no tratados junto con los escarificados negativos, en estos se observó una mayor cantidad de animales con lesiones, 14:29, pero con menor significatividad que en el caso anterior ($p < 0.1$).

No se encontraron relaciones con la respuesta a IDR, al desafío o a la presencia de lesiones en el brote, con el origen de los cabritos en partos dobles o simples. Al revisar los pesos de los cabritos se pudo constatar que la enfermedad se presentó con mayor prevalencia en los animales de menor peso, menos de 10 kg. ($p < 0.05$) y contra lo esperado no se pudieron demostrar diferencias en la ganancia de peso entre los animales enfermos y los no afectados en el mes en que se presentó el brote.

Aunque con baja significatividad, se pudo constatar que las madres con lesiones tuvieron crías con lesiones 7 de 12 y a la inversa las crías de madres que no enfermaron resistieron mejor el brote 23 de 34 ($p < 0.1$).

La contrastante respuesta a IDR en animales menores de 45 días, con lo observado en el experimento 5 en este mismo hato, en que todos los cabritos menores de 4 meses resultaron negativos, puede atribuirse a la posibilidad de una infección en período de incubación, que determinó el brote una semana

después, más que a la posibilidad de haber detectado alguna forma de inmunidad pasiva. Los resultados apoyan la posible existencia de una forma de incubación o un cuadro subclínico, producto quizás de la interacción de la inmunidad calostrada con el virus de campo. De ser correcta esta interpretación, debe postularse que la incubación de la enfermedad es más larga en la infección natural que en la inoculación experimental, en la que la mayoría de los autores señalan el inicio de lesiones a los 3-4 días pos-escarificación (Robinson y Balassu, 1981), aunque ya se señaló que en el experimento 1 algunos cabritos desafiados desarrollaron lesiones hasta 9 días después de la inoculación, soportando la posibilidad de la participación de mecanismos de resistencia particulares, en estas condiciones. La relación entre madres con lesiones y crías con lesiones, apunta también en este sentido.

El que la enfermedad se presentara clínicamente en forma dominante en los animales de menor peso, es un elemento más para sugerir la importancia del calostro en la manifestación clínica de la enfermedad, considerando la relación entre bajo peso y adecuado calostrado, aunque esta relación también pudo estar influenciada por otras enfermedades intercurrentes (especialmente parasitosis) o factores de estrés que pudieron determinar la presentación clínica de la enfermedad y afectar simultáneamente el peso de los animales. De hecho, los pesos de los cabritos eran considerablemente menores de lo esperado para la edad de los mismos, así animales entre los 4 y 5

meses pesaban promedialmente 14 kilos, en el momento del brote.

Igual que los experimentos 1 y 2 se estableció una clara relación entre la presencia de lesiones en el brote y la respuesta de los animales al desafío por escarificación, validando este procedimiento como única alternativa profiláctica para esta enfermedad. La independencia de estos dos fenómenos, de la edad y la respuesta a IDR, apoyan la idea de que la IDR demostró en realidad la presencia de la etapa de incubación de la enfermedad, que fue presumiblemente atemperada por el efecto del desafío.

Igual que en los experimentos 1 y 2, el virus de brote demostró un comportamiento electroforético distinto en las proteínas de superficie, al virus de desafío (cuadro 5, experimento 2), pero a diferencia de lo ocurrido en el brote de esos experimentos, en este caso el virus sí demostró una banda de precipitación con respuesta de identidad con el virus de referencia empleado en el desafío y la IDR (González, 1992).

Contra lo señalado genéricamente en la literatura, que jerarquiza la importancia de la enfermedad al relacionarla con efectos en la alimentación de los animales que presentan lesiones faciales u orales (Robinson y Balassu, 1981), en este caso no se pudieron demostrar diferencias en la ganancia de peso entre los animales enfermos y los sanos en el brote, debe destacarse sin embargo que la condición general de los cabritos distaba mucho de ser óptima y esto pudo ocultar la

expresión de esas diferencias por la pobre alimentación general.

10.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS DATOS ACUMULADOS EN LOS EXPERIMENTOS 1 Y 6.

A los efectos de manejar un mayor número de observaciones los resultados de desafíos, comportamiento en brote de las madres y respuestas de hermanos de camada, en los experimentos 1 y 6 se acumularon, considerando que se trata del mismo rebaño y se emplearon los mismos procedimientos e inóculos en ambas pariciones. Las diferencias entre grupos se evaluaron por la prueba de chi cuadrado

La respuesta al desafío por escarificación según la edad de los cabritos se resume en el cuadro 14 y puede constatarse que el desarrollo de lesiones solo ocurrió en forma significativa en animales desafiados después de los 30-45 días de edad, en la misma forma también las lesiones características, indicativas de los brotes de la enfermedad ocurrieron después de esta edad (cuadro 14), $p < 0.001$ y $p < 0.05$ respectivamente. Entre las dos pariciones se pudieron evaluar 17 partos dobles, en 8 de estos pares los cabritos presentaron las mismas respuestas tanto a la escarificación como en su comportamiento de brote y 4 pares más resultaron con el mismo comportamiento de brote y no fueron escarificados.

Cuadro 14: Resultados acumulados de las respuestas al desafío y el desarrollo de lesiones en los brotes de EC, de los cabritos según su edad (experimentos 1 y 6).

Edad en días	Desafío (+)	Desafío (-)	Enfermaron	No enfermaron	Lesion : Sano
8 a 20	1	10	3	-	4 : 10
21 a 30	4	15	3	-	7 : 15
31 a 45	11	5	1	2	12 : 7
más de 45	15	9	34	24	49 : 33

Se pudo observar una significativa relación entre la presentación o no de la enfermedad en las cabras y en sus crías (cuadro 15), así fue significativamente mayor el número de cabritos enfermos en el brote, en el grupo de cabras que desarrollaron lesiones y viceversa ($p < 0.001$). No se pudo establecer sin embargo, relación entre la respuesta al desafío y el hecho de que las madres enfermaran o no en el brote. Ni entre la respuesta al desafío o el comportamiento en el brote con el tipo de parto doble o simple. Esta marcada diferencia en el comportamiento de madres y crías, según se considere la respuesta al desafío o el desarrollo de lesiones de brote, parece jerarquizar las diferencias antigénicas demostradas entre el virus de desafío y los de brote y la participación de otros factores, diferentes de los mecanismos de inmunidad pasiva, entre los que pueden considerarse factores genéticos u otros influídos por estos. La falta de correlación entre la presentación de enfermedad y el tipo de parto, también apunta a restarle jerarquía a los mecanismos calostrales de protección pasiva, considerando que en los partos dobles las crías son en general más débiles y

susceptibles a enfermedades y disponen de menor cantidad de calostro y leche, que las crías de parto simple.

Cuadro 15: Resultados acumulados (experimentos 1 y 6), de la observación de lesiones en las cabras y sus crías, en los brotes de EC ($p < 0.001$).

	cabrito enfermó	cabrito no enfermó
Cabra enfermó	23	3
Cabra no enfermó	16	22

No se pudo establecer relación entre la escarificación previa y el comportamiento en cuanto a presentar lesiones en el brote. Pero sí entre la escarificación y la gravedad de las lesiones en el brote, los animales escarificados con respuesta positiva, o no enfermaron o presentaron lesiones leves, comparados con los no escarificados o los escarificados sin respuesta ($p < 0.01$). Reforzando observaciones de otros autores, en cuanto a la conveniencia de la escarificación como alternativa profiláctica, aunque no elimine completamente el riesgo de que se presenten lesiones de EC (Wachendörfer y Valder, 1980; Mahnel y Munz, 1987; Buddle y Pulford, 1984)

11. EXPERIMENTO 7. INMUNIDAD PERINATAL EN OVINOS.

A diferencia de en las cabras, en ovinos, se ha señalado la susceptibilidad de los corderos al desafío por escarificación con el virus de EC, aunque se tratara de crías de ovejas consideradas resistentes, inmunes, por haber padecido la enfermedad o por haber sido "vacunadas" anteparto (Boughton y Hardy, 1934; Kerry y Powell, 1971), y aún habiéndose

demostrado la presencia de anticuerpos en el calostro de las ovejas y en el suero de los corderos, luego de la ingestión de este (Buddle y Pulford, 1984). El efecto protector de los anticuerpos calostrales en ovinos, es sin embargo sostenido por otros autores, aunque estos no desafían a los corderos (Poulain et al., 1972; Le Jan et al., 1978; Verdés et al., 1989).

Considerando los resultados obtenidos en cabritos y las contradicciones existentes en la literatura, en cuanto a la resistencia de los corderos al desafío y la enfermedad, se decidió aplicar la misma metodología al análisis del problema en ovinos, con el objetivo particular de intentar establecer la posibilidad de protección calostrala o resistencia a la enfermedad en corderos desafiados.

11.1. MATERIAL Y MÉTODOS.

El trabajo se realizó en el rancho ovino particular con antecedentes de haber padecido brotes de la enfermedad en los últimos 3 años, que fue descrito en el experimento 5 de evaluación en campo de IDR.

Se emplearon 100 hembras, de un total de 460 hembras de cría presentes en el rebaño. Los animales se eligieron considerando su edad y que su aspecto sugiriera que se encontraban gestantes, formando 5 grupos con diferencia de edad de 1 año, 1, 2, 3, 4 y más de 4 años, de 20 ovejas cada grupo. Un mes antes del inicio previsto de los partos, las ovejas fueron escarificadas con el virus de referencia

lío filizado reconstituido con MEM sin suero adicionado de antibióticos, en la cara interna del muslo derecho; mientras en el izquierdo se inoculó para la prueba de IDR, 0.1 ml por vía intradérmica del mismo virus inactivado por calor (1 hora a 70°C) y MEM como control. La prueba de IDR se evaluó a las 48 horas PI y el desarrollo de lesiones en la zona de escarificación fue examinado a los 3, 5, y 8 días PI. A 50 corderos entre 0 y 90 días de edad, 23 hijos de borregas escarificadas y 27 de controles no escarificadas, se les desafió por escarificación con el mismo inóculo que a sus madres.

11.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Por carecer el rancho de instalaciones adecuadas, para retener y examinar el ganado y no estar este correctamente identificado, solo fue posible leer la prueba de IDR en 85 ovejas, resultando positiva en 58 de las mismas, evidenciando la reciente exposición de los animales a brotes sucesivos de la enfermedad. De la misma forma la respuesta al desafío por escarificación, puso en evidencia la resistencia de las borregas a la enfermedad, en 78 de las 85 ovejas, las lesiones al desafío fueron débilmente positivas, con el desarrollo de pequeñas pápulas y vesículas de menos de 2mm de diámetro, en las líneas de la escarificación, sobre las que luego se formaron delgadas costras café amarillentas, las lesiones evolucionaron a la reparación en 10-12 días, 7 animales no respondieron a la escarificación.

Los 50 corderos desafiados desarrollaron lesiones de EC en las zonas escarificadas, indicando la ausencia de alguna forma de inmunidad. No se pudieron establecer relaciones entre la intensidad de las lesiones o su presencia, ni con la edad de las borregas, ni con la de los corderos.

Al igual que en el experimento anterior, la respuesta positiva en IDR no impidió el desarrollo de lesiones, aunque leves, en los animales reactivos, por lo que la prueba debe manejarse como una alternativa para demostrar la exposición previa al virus, más que como demostración de resistencia a la enfermedad.

La falta de correlación entre la respuesta de IDR y la presencia de lesiones en la zona de escarificación, puede explicarse parcialmente por la posibilidad de diferencias antigénicas, entre los virus de campo que determinaron los brotes y el virus de referencia empleado en la prueba de IDR y en el desafío por escarificación, tal como ocurrió en los experimentos de los cabritos. La condición de alimentación en este rancho es deficiente, particularmente en el período final de la gestación de las ovejas y en su lactación y es muy probable que esta condición haya afectado su capacidad de respuesta al desafío, explicando que la mayoría de los animales hayan desarrollado lesiones en la escarificación.

La ausencia de protección calostrual en los corderos, pese a la demostrada condición inmune de sus madres, concuerda con observaciones anteriores en igual sentido (Boughton y Hardy, 1934; Kerry y Powell, 1971; Buddle y Pulford, 1984) y

contradice las observaciones de autores franceses que en realidad no hicieron pruebas de desafío (Poulain et al., 1972; Le Jan et al., 1978). También debe considerarse en el caso de los corderos, que la pobre condición de alimentación de las ovejas, que seguramente afectó su producción de calostro y leche, determinó en estos, una baja capacidad de respuesta al desafío.

Un trabajo más reciente demuestra la presencia de anticuerpos neutralizantes en la leche y el calostro de ovejas vacunadas con una cepa atenuada en cultivos celulares; sin embargo, la vacunación de los corderos a las 2-3 semanas de vida no evitó que se enfermaran y los autores proponen una interferencia entre la vacuna y el calostro por lo que recomiendan revacunar a los corderos a los 5 meses (Verdes et al., 1989). Debe considerarse sin embargo, que el método de desafío empleado es sumamente agresivo y pone al virus directamente en contacto con las células susceptibles y los mecanismos inmunes sistémicos, que fallan en evitar el desarrollo de lesiones en la zona escarificada, pudieran ser eficientes en una infección natural, en que el virus ingresara al organismo por otras vías (digestiva, respiratoria). No puede descartarse por otra parte, la posibilidad de que el desarrollo de la lesión sea consecuencia de fenómenos de interacción con la misma respuesta inmune, en alguna forma de hipersensibilidad, como se discutirá más adelante. Es interesante señalar, que en el año en que se realizó este ensayo, este rancho no presentó un brote de EC, mientras que

los demás ranchos ovinos de la región presentaron la enfermedad.

12. EXPERIMENTO 8. SUSCEPTIBILIDAD COMPARADA DE OVINOS Y CAPRINOS AL EC.

En por lo menos cinco oportunidades, una de ellas la descrita en el experimento 2, se ha observado que en rebaños mixtos en los que conviven ovinos y caprinos, el EC afecta en forma severa a las cabras y no afecta o el brote es sumamente leve, en los ovinos (Tórtora, 1985). Aunque escasas, se han hecho algunas observaciones en este mismo sentido en otros lugares (Hatziolas, 1930; citado por Boughton y Hardy, 1934; Hussain y Burger, 1989; Nfi, 1991). Esta situación puede inducir a errores diagnósticos y la razón de este comportamiento del virus no ha sido aclarada, podría suponerse entre otras situaciones la existencia de biotipos del virus con afinidad de especie, que las cabras son más susceptibles genéticamente y/o que en las cabras ocurren factores predisponentes a la enfermedad que no se presentan en los ovinos en idénticas situaciones de cría.

La escarificación de ovinos con material de costras obtenido en los caprinos, es un procedimiento que permite en la mayoría de los casos confirmar el diagnóstico y que eventualmente descarta la posibilidad de que el virus problema sea específico de las cabras (Tórtora, 1985).

Con el objetivo particular de intentar demostrar la posible mayor susceptibilidad de las cabras al EC y/o la existencia de cepas con afinidad particular o exacerbada de especie, se realizó este experimento.

12.1. MATERIAL Y MÉTODOS.

En el trabajo se emplearon 13 ovinos pelibuey de 5 a 24 meses de edad que se encontraban confinados y reproduciéndose en un corral aislados de otros rumiantes, los animales no habían presentado EC clínico desde que habían sido transportados al corral como corderos, hacía 18 meses. Por otro lado se emplearon 17 cabritos de 3 a 6 meses que tampoco tenían antecedentes clínicos de la enfermedad y que eran parte de un grupo mayor de animales, que incluía cabras de hasta 18 meses. En este caso los corrales de ovinos y caprinos se encontraban separados a más de 500 metros y con construcciones interpuestas.

Se ensayaron en la prueba 4 muestras de EC: dos de origen caprino, una el liofilizado de referencia obtenido en Baja California Sur, la otra una muestra de un brote en las cercanías de Acapulco y dos muestras ovinas, una obtenida en el Valle de Toluca y la otra en Melchor Ocampo, Edo. de México. Las cuatro muestras confirmadas por tinción negativa, habían formado una línea de precipitación en IDD con respuesta de identidad completa, excepto la muestra de Acapulco, que dio una respuesta de precipitación de identidad parcial (Tórtora y García, 1987).

Con el objetivo particular de intentar demostrar la posible mayor susceptibilidad de las cabras al EC y/o la existencia de cepas con afinidad particular o exacerbada de especie, se realizó este experimento.

12.1. MATERIAL Y MÉTODOS.

En el trabajo se emplearon 13 ovinos pelibuey de 5 a 24 meses de edad que se encontraban confinados y reproduciéndose en un corral aislados de otros rumiantes, los animales no habían presentado EC clínico desde que habían sido transportados al corral como corderos, hacía 18 meses. Por otro lado se emplearon 17 cabritos de 3 a 6 meses que tampoco tenían antecedentes clínicos de la enfermedad y que eran parte de un grupo mayor de animales, que incluía cabras de hasta 18 meses. En este caso los corrales de ovinos y caprinos se encontraban separados a más de 500 metros y con construcciones interpuestas.

Se ensayaron en la prueba 4 muestras de EC: dos de origen caprino, una el liofilizado de referencia obtenido en Baja California Sur, la otra una muestra de un brote en las cercanías de Acapulco y dos muestras ovinas, una obtenida en el Valle de Toluca y la otra en Melchor Ocampo, Edo. de México. Las cuatro muestras confirmadas por tinción negativa, habían formado una línea de precipitación en IDD con respuesta de identidad completa, excepto la muestra de Acapulco, que dio una respuesta de precipitación de identidad parcial (Tórtora y García, 1987).

Los inóculos se prepararon mediante la maceración de las costras en mortero Tenbroeck con MEM adicionado de antibióticos y una posterior centrifugación para emplear los sobrenadantes, el liofilizado se reconstituyó con MEM a su volumen original. De cada suspensión se prepararon 5 diluciones: 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 y 1:1000, que junto con la suspensión sin diluir se aplicaron por vía intradérmica (ID) y por escarificación (ES) en la cara interna de ambos muslos, delimitando con un marcador los campos para cada aplicación. Los sitios de inoculación fueron examinados diariamente en los siguientes 21 días a la misma. La distribución de los animales y los inóculos se presentan en el cuadro 16.

A todos los ovinos y a cinco cabritos, se les realizó simultáneamente la prueba de IDR con virus inactivado por calor (1 hr./70°C), tal como se describió anteriormente, la prueba se leyó a las 48 horas PI.

12.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Todos los ovinos y tres de los cinco cabritos, resultaron negativos a la prueba de IDR, indicando que los ovinos no tenían antecedentes, por lo menos cercanos, de haber estado expuestos al virus, mientras que los cabritos por el contrario eran una población expuesta, aunque no tuvieron antecedentes clínicos de la enfermedad.

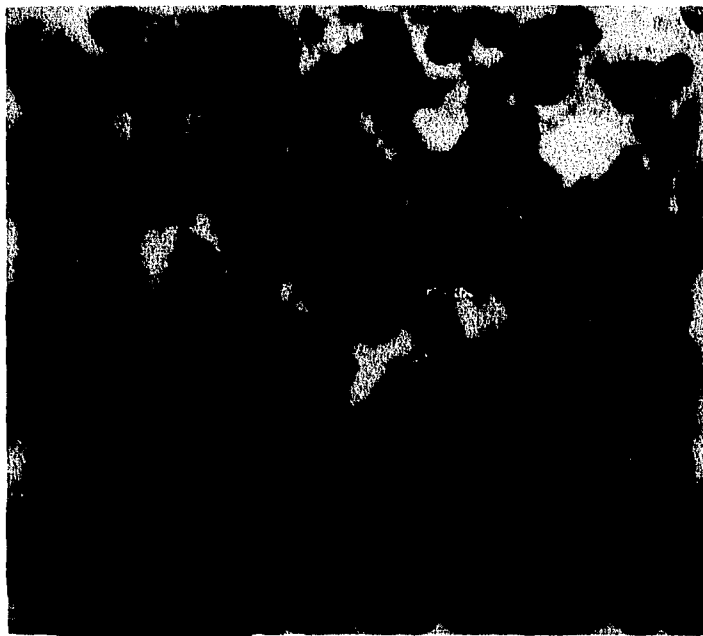
En el cuadro 16 se describe el procedimiento de inoculación y los resultados obtenidos con virus virulento por vía ID y

ES. Los ovinos se distribuyeron en los cuatro grupos procurando igualar edades y condición; todos los grupos tuvieron un animal entre los 5 y 7 meses y el grupo donde se ensayó el liofilizado, incluyó dos de estos animales.

Se logró el desarrollo de lesiones en el desafío, con mayor eficiencia en las zonas escarificadas, que cuando el inóculo se aplicó por vía ID, quizás porque la escarificación pone al virus directamente en contacto con una mayor extensión de células epidérmicas susceptibles, las lesiones por escarificación se lograron en general a mayores diluciones que por vía ID (fotografía 8).

Todos los resultados negativos por vía ID ocurrieron en los ovinos (7 casos) y en 5 de 6 casos en la escarificación. Si bien los ovinos desarrollaron lesiones con todas las cepas, la respuesta a las cepas caprinas fue leve, las lesiones se resolvieron en poco tiempo y se presentaron sólo al inocular bajas diluciones del virus. Las lesiones en los caprinos se presentaron en forma constante; sólo se obtuvo una respuesta negativa a escarificación con una cepa ovina y con tres de las muestras, las lesiones en los cabritos se desarrollaron con diluciones mayores y en general evolucionaron en igual tiempo que en los ovinos o incluso perduraron por más tiempo. Solo en el caso de la muestra ovina de Melchor Ocampo (cepa 21), los ovinos presentaron lesiones de mayor persistencia y con diluciones mayores que en el caso de los cabritos.

FOTOGRAFIA 7: Histología de la biopsia de un punto positivo a la aplicación intradérmica del virus de EC inactivado por calor. li, linfocito; lb, fibroblasto; m, mononuclear de tipo macrófago; p, polimorfonuclear. Hematoxilina-eosina, 480 x.



FOTOGRAFIA 8: Lesiones del virus de EC en un cabrito, aplicado a diferentes diluciones (SD, 1:10, 1:50), por escarificación (E) e intradérmico (D), en la cara interna del muslo.

FOTOGRAFIA 9: Lesiones por parapoxvirus en el humano. La fotografía se tomó dos meses después de iniciada la dermatitis.



Cuadro 16: Resultados obtenidos al infectar por vía intradérmica (ID) y escarificación (ES) a ovinos (Ov) y caprinos (Cp), en forma cruzada, con cepas de EC de origen ovino y caprino respectivamente.

Cepa de EC	Especie animal infectada	Vía ID, máxima dilución y último día PI con lesión.	ES, máxima dilución y último día PI con lesión.
1	Ov 1	(-)	1: 10, 4 to. día
1	Ov 2	(-)	1: 50, 4 to. día
1	Ov 3	(-)	(-)
1	Ov 4	(-)	(-)
1	Cp 1	1: 50, 11vo. día	1: 50, 4 to. día
1	Cp 2	1: 50, 11vo. día	1: 100, 4 to. día
1	Cp 3	1: 10, 8 vo. día	1: 100, 4 to. día
1	Cp 4	1: 50, 4 to. día	1: 50, 4 to. día
9	Ov 5	S/D, 3 cr. día	(-)
9	Ov 6	(-)	(-)
9	Ov 7	(-)	(-)
9	Cp 5	1: 50, 4 to. día	1: 500, 4 to. día
9	Cp 6	1: 50, 4 to. día	1: 500, 4 to. día
9	Cp 7	1: 10, 4 to. día	1: 500, 4 to. día
14	Ov 8	1: 10, 7 mo. día	1: 10, 14vo. día
14	Ov 9	1: 10, 7 mo. día	1: 50, 4 to. día
14	Ov 10	1: 10, 7 mo. día	1: 50, 8 vo. día
14	Cp 8	1: 50, 7 mo. día	1: 500, 4 to. día
14	Cp 9	1: 100, 8 vo. día	S/D, 4 to. día
14	Cp 10	1: 10, 4 to. día	1: 100, 4 to. día
14	Cp 11	1: 100, 8 vo. día	(-)
21	Ov 11	(-)	1: 50, 4 to. día
21	Ov 12	1: 50, 7 mo. día	1: 100, 11vo. día
21	Ov 13	S/D, 4 to. día	1: 100, 18vo. día
21	Cp 12	1: 50, 11vo. día	1: 50, 18vo. día
21	Cp 13	1: 50, 11vo. día	1: 50, 11vo. día
21	Cp 14	1: 50, 11vo. día	1: 50, 14vo. día
21	Cp 15	1: 50, 11vo. día	1: 100, 8vo. día
21	Cp 16	1: 50, 10mo. día	1: 50, 14vo. día

S/D, respuesta en el punto en que se aplicó el virus sin diluir.

Cepa 1, de referencia, obtenida de cabras en Baja California Sur, en 1979.

Cepa 9, obtenida de cabras de Acapulco, Guerrero, en 1980.

Cepa 14, obtenida de ovinos en Toluca, Edo. de México, en 1982.

Cepa 21, obtenida de ovinos en Melchor Ocampo, Edo. de México, en 1985.

Si bien los resultados no son concluyentes, mientras los ovinos fueron poco sensibles a las muestras caprinas, los cabritos dieron respuestas de mayor intensidad en el

desarrollo de las lesiones (mayor dilución del virus y mayor duración de la lesión) incluso con las muestras ovinas, lo que sugiere una mayor susceptibilidad de los caprinos al EC que los ovinos. Debe considerarse que los cabritos por su edad serían más sensibles a la enfermedad que los ovinos, pero es igualmente necesario considerar que mientras todos los ovinos fueron negativos a la prueba de IDR y por ende no se habían expuesto al virus, los cabritos resultaron positivos y podía esperarse en consecuencia una mayor resistencia en ellos que en los ovinos.

La identidad antigénica de las muestras y los resultados obtenidos en las dos especies, hace poco probable sostener la idea de la existencia de biotipos por especie en la discusión de estos resultados, aunque si parece existir diferente virulencia de las cepas para estas dos especies y/o de comportamiento biológico, que pudiera determinar diferencias en los umbrales de infección para cada una.

13. EXPERIMENTO 9. INFECCIÓN MIXTA DE EC Y *DERMATOPHILUS CONGOLENSIS*.

La asociación de *D.congolensis* y EC ha sido señalada y descrita por diversos autores (Cooper et al, 1970, citado por Robinson y Balassu, 1981; Munz, 1976; Abu-Samra y Walton, 1981; Podestá et al, 1984; Yeruham et al.,1991), esta asociación también se ha señalado para los parapox bovinos (Aguilar et al, 1980). Considerando que ambos agentes

determinan respuestas semejantes e interactúan en la piel con los mismos o muy semejantes mecanismos inmunes (Jenkinson et al, 1990 a; Yeruham et al.,1991), es posible que la presencia de los dos agentes en las lesiones de campo sea mucho más que una asociación fortuita y oportunista y podría ser importante en la evolución y demás características epidemiológicas de la enfermedad.

Con el objetivo particular de establecer la posibilidad de esta interacción en los brotes de EC en México y poder contar con un aislamiento de la bacteria para futuros ensayos de interacción virus-bacteria, se realizó el siguiente trabajo, considerando entre otras cosas que la bacteria solo había sido comunicada en una oportunidad en el país.

13.1. MATERIAL Y MÉTODOS.

Se examinaron 8 muestras de costras de origen ovino ya confirmadas como EC en tinción negativa. Las costras se embebieron en solución salina y se desmenuzaron con aguja en portaobjetos extendiendo el material en la superficie de vidrio, se dejaron secar a temperatura ambiente y se colorearon con Giemsa (1:10); se realizó luego la observación con objetivo de inmersión (1000x) buscando los filamentos segmentados característicos de la bacteria. Tres de las muestras evidenciaron estructuras sugestivas, partes de estas costras (0.3 aproximadamente) se maceraron y se colocaron en frascos con agua destilada (1 ml.), se incubaron a 37°C por 4

horas en una jarra de microaerofilia con una vela encendida para producir una atmósfera de 5-10% de CO₂.

Los sobrenadantes de las muestras así preincubadas se sembraron en agar sangre bovina 5% y se incubaron en las mismas condiciones descritas por 48 horas. Las colonias adherentes y con βhemólisis se caracterizaron bioquímicamente y se compararon serológicamente con una cepa de referencia de *D. congolensis* de la Universidad de Iowa USA corroborando se trataba de la bacteria en cuestión pese a haber desarrollado en colonias lisas (Cruz et al., 1990a,b).

13.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

De las tres muestras sugestivas a la inspección microscópica directa sólo una desarrolló las colonias de *D. congolensis*.

La muestra positiva en cultivo a *D. congolensis*, correspondió a un brote de EC especialmente grave tanto por la severidad de las lesiones como por el largo tiempo que transcurrió para que se resolvieran. El brote se presentó en un rancho productor de ganado Suffolk de registro y es posible que la severidad del cuadro se haya debido a la infección mixta, pues los animales se encontraban en excelente estado físico y la anamnesis de rutina no pudo establecer la presencia de situaciones estresantes.

Las costras evaluadas tenían diferentes tiempos de conservación en congelación: de 5 meses a 8 años. La muestra que resultó positiva era la más reciente (5 meses); es

posible que la congelación prolongada en la costra hubiera afectado la viabilidad de *D. congolensis*.

14. EXPERIMENTO 10 INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON EC Y *D. CONGOLENSIS*.

Con el objetivo particular de intentar evaluar la posible interacción del virus de EC y *D. congolensis* en la presentación de dermatitis, se realizó el siguiente ensayo.

14.1. MATERIAL Y MÉTODOS.

Se emplearon 10 corderos de entre 3-4 meses de edad y 18 a 25 kg. de peso, del rebaño de la FES-C, con el antecedente de haber padecido un brote leve de EC dos meses antes. Lamentablemente no se pudo establecer si los animales empleados habían o no presentado lesiones en el brote que transcurrió con baja morbilidad y lesiones de poca intensidad (se estimó, por los responsables del rebaño, que afectó al 10-20% de los corderos). Se empleó la muestra de referencia como virus de desafío y como antígeno inactivado por calor (1 h/ 70°C) para IDR, resuspendida en MEM sin suero y adicionado de antibióticos. La cepa de *D. congolensis* evaluada en el experimento 10 fue utilizada luego de crecimiento por 48 horas en BHI y ajustada al valor 1 de McFarland (1.5×10^8 células por ml.) La misma suspensión bacteriana fue inactivada por calor (80°C/30 min.) y con formalina al 0.25% para ser ensayada en pruebas de IDR.

Todos los animales fueron inoculados por escarificación en la axila derecha con EC, en la izquierda con *D. congolensis*, en la ingle derecha con EC y *D. congolensis* simultáneamente y en la izquierda con solución salina.

En la ingle izquierda se delimitaron 4 campos en los que se aplicaron los inóculos de la prueba de IDR, 0.1 ml. de EC, *D. congolensis* inactivado por calor y formalina y un punto control con solución salina. Las zonas escarificadas se examinaron diariamente en los siguientes 15 días y los puntos de IDR se leyeron a las 48 horas PI. Las pruebas de IDR para *D. congolensis* se repitieron a los 60 días posdesafío y al mismo tiempo se ensayó la aplicación intradérmica de *D. congolensis* virulento.

Los animales fueron sangrados al desafío y 15 y 45 días PI, para obtener sueros que se evaluaron por IDD y CIE contra EC y *D. congolensis* sonificado a 16.000 de amplitud por 20 minutos, previa inactivación de las células con formalina al 1%, la formalina se eliminó antes y después del sonificado por diálisis (Cruz et al., 1990 b).

Se tomaron biopsias de las pruebas de IDR positivas a *D. congolensis* y de las zonas con lesión al desafío por escarificación, que se fijaron en formalina al 10% y se procesaron para cortes de parafina y tinción con hematoxilina y eosina.

14.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados del experimento se resumen en el cuadro 17. En 7 de los 10 corderos se presentó una respuesta positiva a la IDR con EC confirmando la exposición previa de los animales al brote, cinco animales respondieron también positivamente a *D. congolensis* inactivado por calor. Los tres animales que no respondieron a la IDR con EC tampoco lo hicieron a *D. congolensis*. Un animal reaccionó en forma clara al *D. congolensis* inactivado con formalina 0.25% y dos lo hicieron en forma leve.

Todos los animales resultaron negativos al desafío con EC y sólo un animal desarrolló lesiones sugestivas en la escarificación con *D. congolensis*, consistentes en eritema y finas costras de exudado amarillentas hasta los 8 días PI.

En contraparte, 9 de los animales desarrollaron lesiones sugestivas en la ingle escarificada con EC y *D. congolensis* simultáneos, consistentes en eritema, pequeñas pústulas y costras delgadas café-amarillentas, que evolucionaron desde el 2º día PI, hasta los 7-10 días. Las lesiones fueron muy semejantes a las observadas en los desafíos con EC (Tórtora, 1985). De estas costras se tomaron muestras para evaluación con tinción negativa e intento de aislamiento de *D. congolensis* en 6 animales. En microscopía electrónica sólo se demostraron partículas del tipo 2 (permeables, no infectantes) y en 3 de las muestras (corderos 1, 3 y 7) se reaisló la bacteria.

Cuadro 17: Respuesta de los corderos al desafío y la intradermorreacción antes y después del mismo, con EC y *D. congolensis* (Experimento 10).

Cordero N°	IDR predesafío			D e s a f í o			Reaislamiento de Dc.	IDR posdesafío 60 días PD		Dc. virulento intradermo.
	EC calor	Dc. calor	Dc. formol	EC	Dc.	EC+Dc.		Dc. calor	Dc. formol	
1	+	+	-	-	-	+	+	-	+ 7d	nódulo eritema
2	+	+	d	-	-	+	+	-	+ 7d	pústula
3	+	-	d	-	+	+	+	-	+ 8d	-
4	-	-	-	-	-	+		+	+ 8d	pústula
5	-	d	-	-	-	+		-	- 8d	eritema
6	+	+	-	-	-	+		-	+ 7d	pústula
7	+	d	+	-	-	+	+	+	-	-
8	+	-	-	-	-	+		-	+ 8d	-
9	-	-	-	-	-	-		-	+ 8d	-
10	+	-	+	-	-	+		+	+ 8d	pústula-eritema

(+) lesión característica o respuesta positiva a IDR

(d) reacción dudosa a IDR

(-) reacción negativa a IDR o ausencia de lesión.

La prueba de IDR realizada a los 60 días PI, modificó completamente su respuesta, 7 de los animales respondieron positivamente al antígeno formalinado, con respuestas que perduraron 7 y 8 días PI y un animal respondió en forma positiva al calentado y negativamente al formalinado. Curiosamente este animal había respondido en la forma inversa en la primera prueba.

La inoculación de *D. congolensis* virulento por vía ID, determinó lesiones sugestivas de infección en cinco animales, con eritema y desarrollo de una lesión de aspecto pustular, mientras que cuatro presentaron eritema persistente hasta el 4-8 día PI sugiriendo una infección de menor intensidad un animal resultó negativo.

Las respuestas de IDR no se pudieron correlacionar con las de desafío, comportándose en este sentido *D. congolensis* como EC (Exps 5, 6, 7 y 8), lo que sugiere que la prueba de IDR si demuestra la exposición a la bacteria, pero no es indicativa de una respuesta inmune protectora, al menos para el desafío por escarificación. Aunque puede considerarse la posibilidad de que las respuestas de IDR a la bacteria, correspondieran a falsos positivos.

Las pruebas serológicas resultaron negativas en todos los casos a ambos antígenos, confirmando que en este tipo de cuadros son más importantes las respuestas locales que las sistémicas (Cruz, 1990 b).

La histología de los puntos positivos a IDR demostró un abundante infiltrado linfocitario, confirmando su carácter de

una respuesta de hipersensibilidad de tipo IV. Mientras que las biopsias de las zonas de desafío con EC y *D. congolensis* evidenciaron congestión y edema y un abundante infiltrado de neutrófilos que se aglomeraban en las costras, epidermis y dermis.

Los resultados sugieren un efecto sinérgico entre el virus y la bacteria, en animales que demostraron una respuesta inmune evidenciable en IDR y con capacidad para impedir el desarrollo de lesiones con los patógenos por separado. La demostración de partículas virales dañadas de tipo 2 en las costras, podría indicar que la respuesta inmune está establecida por la exposición al brote, fue capaz de impedir la replicación del virus y generar formas infectantes, aunque no logró impedir el efecto sinérgico de los dos patógenos y particularmente el establecimiento de *D. congolensis* que fue recuperado de las costras. La presencia de los neutrófilos en la lesión es un elemento común a la respuesta de ambos patógenos (Jenkinson et al., 1990 a). La interacción EC-*D. congolensis* podría explicar los brotes en animales vacunados o presuntamente inmunes.

Los cambios en la respuesta de IDR a *D. congolensis* en sus dos presentaciones antigénicas, luego de la exposición de desafío, 60 días PI, son difíciles de explicar. El que la respuesta al antígeno formalinizado haya perdurado 7-8 días, sugiere la posibilidad de una reacción por irritación química. Sin embargo, se utilizó el mismo preparado en ambos casos por lo que este razonamiento no parece lógico. Podría

suponerse un cambio en las características de la respuesta inmune luego del desafío, con diferente capacidad para reconocer los antígenos en la IDR.

15. EXPERIMENTO 11. DESCRIPCIÓN DE UN CASO HUMANO DE DERMATITIS POR PARAPOXVIRUS.

El caso se presentó en una estudiante de veterinaria ya egresada de 25 años de edad, que presentó lesiones pruriginosas, exudativas y descamantes, en el extremo del pulgar derecho debajo de la uña y en la piel de la cara flexora de la articulación entre la segunda y tercera falange del dedo índice de la mano izquierda. Cuando se observaron por primera vez las lesiones ya tenían 4 semanas de evolución y la estudiante señaló que hubo una etapa de aspecto vesicular con salida de líquido transparente. Se tomaron fotografías un mes después de la primera observación y a dos meses de que se iniciaran las molestias, sin que hubiera cambiado el aspecto de un mes atrás (fotografía 9).

Se utilizó el material descamado de las lesiones a un mes de iniciado el cuadro, se maceraron las costras y con el sobrenadante se realizó la tinción negativa para buscar las partículas virales características de los parapox en microscopía electrónica; el resultado fue positivo y se confirmó el diagnóstico de lesión causada por parapoxvirus.

Confirmado el diagnóstico se realizó una nueva entrevista y no se pudo establecer ninguna relación con bovinos o pequeños rumiantes enfermos previo a la presentación de las lesiones y el único contacto con especies susceptibles fue la participación un mes antes del inicio de las lesiones, en la ruminotomía de una oveja, en carácter de ayudante-observadora. Tampoco se pudo establecer ninguna otra condición de enfermedad o tratamiento en asociación con la presentación de las lesiones.

A fines del quinto mes las lesiones ya se observaban cicatrizadas, con hiperqueratosis, menor pigmentación en la zona y reducción a la mitad del área afectada, pero ya no ocasionaban molestias.

No fue posible establecer el origen de la infección y llama la atención el que no hubo contacto con especies susceptibles, excepto el caso de la oveja de la ruminotomía, por lo que cabe la posibilidad de que esta haya provenido de objetos contaminados, como instalaciones, instrumental o incluso la lana de la oveja intervenida quirúrgicamente (Leavell et al., 1968; Robinson y Petersen, 1983).

No se pudo tampoco establecer en la anamnesis del caso, la ocurrencia de alguna situación inmunosupresora, por tratamiento médico u otra enfermedad asociada, de las que ya se han señalado como importantes en casos humanos (Savage y Black, 1972; Hunskaar, 1986).

La falta de relación con casos clínicos en animales, es un factor que seguramente hace difícil el diagnóstico clínico

presuntivo y por otra parte los médicos no están familiarizados con esta zoonosis (Schnurrenberger et al., 1980).

La revisión de literatura demuestra que los veterinarios y estudiantes de veterinaria son el tercer grupo ocupacional de frecuencia de la enfermedad en humanos precedidos por los operarios de rastros y los trabajadores y propietarios de ranchos (Tórtora, 1985).

16. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos confirmaron la incapacidad de los corderos de resistir el desafío por escarificación, pese a ser hijos de hembras que habían padecido la enfermedad y a las que se les había reforzado esta respuesta mediante escarificación anteparto (Boughton y Hardy, 1934; Kerry y Powell, 1971; Valder et al., 1979; Buddle y Pulford, 1984). Por el contrario los resultados obtenidos en los cabritos sugieren fuertemente la existencia de alguna forma de inmunidad calostrual o que los animales son refractarios al desafío quizás por la mediación de mecanismos no específicos de resistencia. Es posible que las diferencias entre las especies pueda atribuirse a la cantidad de calostro producido, o a diferencias cualitativas entre ambos, pero no debe descartarse la posibilidad de alguna situación que reduzca o impida la multiplicación del virus en las células epidérmicas de los cabritos, tal como parece ocurrir con el diferente comportamiento del virus en cultivos celulares de líneas establecidas (Tórtora, 1985).

Las células de la piel fetal de cabritos se comportan sin embargo, como un adecuado sustrato para la multiplicación viral *in vitro*, aunque las células del monoestrato tienen mayoritariamente aspecto fibroblástico (Tórtora, 1985).

Los resultados obtenidos en cada parición (Exps. 1, 2 y 6) y el análisis conjunto de ambos, indican una fuerte relación entre la presentación de la enfermedad en las crías y en sus

madres, sugiriendo que el estado inmune y la resistencia de las madres influyen en la resistencia de sus crías ($p < 0.01$); las respuestas idénticas observadas en 12 de los pares de cabritos de 17 partos dobles apunta en el mismo sentido. Pero quizás el resultado más importante fue la dificultad en inducir lesiones al desafío, a cabritos menores de 30 días ($p < 0.01$) y aún a los 45 días ($p < 0.05$). En principio esta resistencia puede atribuirse a alguna forma de protección calostrual o de resistencia inespecífica como se señaló más arriba; pero es también posible suponer la participación de mecanismos de hipersensibilidad en la inducción de las lesiones, mecanismos cuyos mediadores podrían estar ausentes en los cabritos por su edad o bien de alguna manera bloqueados por los anticuerpos calostrales. O incluso es posible plantear la posibilidad de que se establezcan mecanismos de tolerancia a la infección, si esta se establece tempranamente en los recién nacidos, como parecen indicar las respuestas positivas a IDR observadas en cabritos de menos de 30 días en el experimento 6; y si como se ha planteado, la piel es un sitio de "educación" y maduración linfocitaria, en el que las células se capacitan en el reconocimiento de antígenos propios y extraños (Bos y Kapsenberg, 1993).

Las respuestas a la IDR en los cabritos del experimento 6 sugieren que tempranamente los animales entraron en contacto con el virus y sin embargo no enfermaron, soportando la posibilidad de la existencia de alguno de los mecanismos

anotados. De otra manera, la respuesta a la IDR podría estar demostrando esa resistencia calostrual, lo que es muy poco probable a la luz del conocimiento actual, en particular de los mecanismos de reconocimiento antigénico en la piel (Bos y Kapsenberg, 1986 y 1993; Jenkinson et al., 1990a), en donde la participación de anticuerpos parece poco o nada importante. Por el contrario, la demostración de que la presencia de anticuerpos reduce la respuesta de células T (Yirrell et al.1989), podría apoyar la idea de un mecanismo de lesión de hipersensibilidad bloqueado por los anticuerpos calostrales.

En resumen la evidencia acumulada en los dos experimentos indica que los cabritos, si entraron en contacto con el virus precozmente y sin embargo al no desarrollar lesiones demostraron resistencia a la enfermedad; resistencia que incluso evitó las lesiones de desafío y que comenzó a declinar a los 30-45 días, coincidiendo con los tiempos señalados para la protección calostrual en otras enfermedades, aunque es posible que en este caso la "protección" en términos de presentación de lesión no necesariamente dependa de la neutralización del virus y sí del bloqueo de mecanismos efectores de la respuesta inmune.

La condición inmune de las madres fue demostrada por la presencia de anticuerpos en el calostro, que se pusieron en evidencia con técnicas relativamente poco sensibles como la CIE. La importancia de estos anticuerpos como forma de resistencia en los cabritos a EC, sólo se podría explicar por

respuestas mediadas por complemento, células K o macrófagos. La demostrada presencia de un abundante exudado de neutrófilos en las lesiones de EC e incluso en las respuestas de IDR, coincidente con la observación de otros autores, indica que los neutrófilos no se reclutan en la zona en forma inespecífica (Jenkinson et al., 1990a) y bien podrían estar actuando como células K citotóxicas mediadas por anticuerpos. Es importante destacar que el desafío por escarificación impide la participación de mecanismos sistémicos de resistencia, al poner al virus en contacto directo con las células epidérmicas sensibles, mecanismos que podrían ser importantes en la transmisión y patogenia de la enfermedad natural. Sin embargo, también las lesiones de brote se presentaron en animales de más de 45-50 días, incluso en el animal huérfano separado del rebaño, apoyando la idea de una infección temprana y de la ruptura de la inmunidad a una edad definida en esa parición.

La interacción de factores en la presentación del cuadro clínico de EC en el brote natural, se presenta mucho más complejo que la postulada presencia del virus que puede contaminar heridas, transmitiéndose en forma directa y que no explica la presentación explosiva de la enfermedad en animales lactantes o con buena disponibilidad de forraje (Hawkins et al., 1991; Gardiner et al., 1967; Tórtora, 1985). La existencia de infecciones latentes no ha podido ser demostrada cabalmente (Robinson y Balassu, 1981) y los intentos por reactivar estas infecciones con tratamientos

inmunosupresores han fracasado (Zarnke y Dieterich, 1985; Tórtora, 1985).

La observación de una alta proporción de animales reactivos a la prueba de IDR en el rebaño ovino de la FES-C expuesto al brote de EC de las cabras, pero que no habían desarrollado lesiones (Exps. 2 y 5) y la respuesta de los cabritos, reactivos a IDR antes del brote (Exp. 6), son una razonable evidencia de animales con una infección latente, o en etapa de incubación de la enfermedad, que en los ovinos no llegó a expresarse en un brote y que en los cabritos en cambio determinó un brote a los 7-10 días de la respuesta positiva en la IDR. El mayor manejo a que se expone el rebaño caprino, con las actividades propias de la ordeña, así como la actitud más inquieta de estos animales comparado con los ovinos, justifica el suponer la participación de situaciones de estrés en la presentación clínica de la enfermedad, con mayor intensidad en las cabras que en los ovinos.

En las cabras del Exp. 2, las lesiones en los pezones pueden asociarse a la condición de estrés provocada por el destete y el inicio de la ordeña manual, así como a la mayor actividad descamativa de la piel asociada a la ordeña. Pero fue claro en este caso, y se repitió en el Exp. 6, que las lesiones en las tetas de las cabras no tuvieron que ver con la presencia de lesiones faciales u orales en las crías amamantadas, como se señala en la literatura que propone mecanismos directos de transmisión (Buddle y Pulford, 1984; Coates y Hoff, 1990); Incluso animales no paridos, vacíos, desarrollaron las

lesiones en pezones durante el brote en las madres (Exp. 6), descartando en estos casos también las situaciones de estrés y los estímulos al epitelio por la ordeña, aunque debe destacarse que la actividad de la ordeña modifica las rutinas de todo el rebaño, incluidos los animales no paridos. La presentación de las lesiones de EC, en los cabritos de menor peso ($p < 0.05$) (Exp. 6) sugiere que como en otras enfermedades, la condición general de los animales, particularmente la malnutrición, es un factor de importancia en la presentación de esta enfermedad. Sin embargo, es importante considerar que el bajo peso no sólo indica defectos en la alimentación y puede también asociarse a otras enfermedades intercurrentes, que como las parasitosis han sido asociadas a EC. (Linnabary et al., 1976) o a factores de manejo e instalaciones (hacinamiento, comederos, convivencia de animales de diferentes características y jerarquías en el rebaño) que condicionan el buen rendimiento productivo y evidencian situaciones de estrés social en los animales. La interacción con otros patógenos podría ser otro mecanismo importante en la presentación de las lesiones en los brotes, sea porque interfieren con mecanismos de resistencia locales (integridad de epitelios, células de respuesta inmune inespecíficas o específicas) o porque promueven cambios metabólicos y/o vasculares que facilitan la multiplicación viral. En este sentido *D. congolensis* ha sido señalado como uno de estos patógenos (Robinson y Balassu, 1981; Podestá et al., 1984). Esta bacteria parece estimular mecanismos inmunes

semejantes a los de EC (Jenkinson et al., 1990 a) y su capacidad de producir lesión se asocia fuertemente con condiciones de humedad (Cruz et al., 1990 a). En México, los brotes de EC se presentan con cierta estacionalidad al inicio de los meses de lluvia (Tórtora, 1985) y esta situación podría jerarquizar esta asociación. Los resultados obtenidos en este sentido parecen apoyar la importancia de esta asociación, en la que aparentemente el virus actuaría como factor primario facilitando la multiplicación bacteriana y prolongando la resolución de las lesiones.

Ambos patógenos sin embargo, son capaces de producir lesiones en forma independiente y su acción sinérgica más bien explicaría brotes de características epidemiológicas anómalas, como la presentación de EC en animales vacunados o expuestos, o la de brotes de singular gravedad por su duración o la intensidad de sus lesiones. Se debe considerar además la posibilidad de que las zoosporas de *D. congolensis* y el virus de EC, persistan juntos en las costras secas descamadas de las lesiones, perdurando por largos períodos en el ambiente y posibilitando la infección simultánea de los animales por ambos patógenos.

En apoyo a la propuesta de mecanismos directos de transmisión de la enfermedad debe destacarse la presencia de virus en las lesiones papilomatosas, poco importantes clínicamente, que se observaron en las cabras del experimento 1 y que podrían explicar la permanencia del virus por largo tiempo en el rebaño, de parto a parto, junto con la aceptada resistencia

del agente en el medio ambiente (Boughton y Hardy, 1934; Hart et al., 1949; Livingston y Hardy, 1960). Debe recordarse sin embargo, que la cantidad de virus en este tipo de lesiones crónicas es generalmente baja (Romero Mercado et al. 1973 a, b), aunque en este caso las partículas virales se observaron con facilidad y es posible que esto dependa del tipo de lesión, costrosa o papilomatosa, y afecte la producción viral, al modificar la actividad epitelial en el proceso de reparación. La interacción con un papillomavirus implicaría una relación sinérgica en este sentido, al mantener una elevada dinámica de multiplicación y metabolismo celular en el epitelio que favorecería la actividad del virus de EC, como se ha señalado en asociación con otros procesos cicatrizales (Beck y Taylor, 1974; Ames et al., 1984; Hosser et al., 1989). De hecho la evidencia disponible sugiere la posibilidad de que la multiplicación viral podría asociarse fuertemente a particularidades de la célula infectada, ya sea en cultivos celulares (Nagington, 1964; Tórtora, 1985), o en la piel del animal (Ames et al., 1984; Hosser et al., 1989; Jenkinson et al., 1990b y 1991); pudiendo incluso explicarse el fenómeno de enfermedad más en función de la condición celular y el equilibrio con la respuesta inmune, que por la presencia del virus. La asociación de parapoxvirus con papillomavirus ha sido también reportada en bovinos, en una lesión cutánea en la mandíbula de un becerro, sin precisar la especie del virus involucrado (Gerdes et al., 1991).

El análisis electroforético de la composición antigénica de los virus de brote, comparado con el del virus liofilizado empleado en los desafíos experimentales y las pruebas de IDR (cuadro 5), puso en evidencia variaciones en los péptidos localizados entre los PM de 35 a 55 Kd, señalados como atribuibles a los componentes del filamento que envuelve al virus y considerados de suma importancia en la variación antigénica determinante de la respuesta inmune (Buddle et al., 1984 a; Mc Keever et al., 1987; González, 1992). Estas variaciones podrían explicar el que no se pudiera demostrar una relación entre la escarificación de desafío, considerada como profiláctica y la aparición de lesiones en los cabritos (Exps. 2 y 6). Sin embargo, sí se observó un efecto en cuanto a la reducción de la intensidad de las lesiones (gravedad, persistencia) en los animales desafiados que desarrollaron lesiones y los no escarificados o que resultaron negativos al desafío ($p < 0.01$).

Es necesario también considerar que en el caso del Exp. 6 la respuesta en la IDR, sugiere que al ser escarificados en el desafío ya los cabritos podrían haber estado incubando la enfermedad. Los resultados obtenidos en el desafío y la presentación de enfermedad permiten recomendar que en los cabritos la escarificación con fines profilácticos, se realice entre los 35 y 45 días de edad para evitar interferencias con la posible respuesta calostrual y reducir o impedir la presentación de lesiones de brote.

Las diferencias anotadas en la composición antigénica de los virus de campo con el virus de desafío, no deben dejar de considerar el hecho de que estos virus demostraron bandas de precipitación con respuesta de identidad en la IDD. Estos antígenos comunes y capaces de inducir la respuesta humoral en el conejo, podrían ser sumamente importantes en la reducción de los efectos del brote en los cabritos escarificados con resultado positivo y permite sostener la recomendación de no introducir "vacunas" del extranjero que pudieran modificar este espectro antigénico relacionado, introduciendo variantes del virus no cubiertas antigénicamente por las cepas nacionales (Tórtora, 1985; Tórtora y García, 1987).

Colateralmente se demostró la relación antigénica y de patogenicidad entre EC y los parapox bovinos, identificados en muestras de la misma unidad productiva de la FES-C. Los resultados prácticamente idénticos logrados en el experimento de IDR con virus inactivados por calor de EC y PVB en cabritos y corderos (Exp. 4) indican que fueron reconocidos por los mismos o muy similares mecanismos locales de respuesta inmune en una respuesta cruzada.

La aplicación intradérmica de las partículas virulentas también determinó básicamente las mismas respuestas en los animales ensayados, demostrando la susceptibilidad de ovinos y caprinos a los virus de origen bovino aplicados por esta vía pero además que estuvieron expuestos a los mismos

mecanismos de resistencia y susceptibilidad que el virus del EC.

Al comparar los virus bovinos con las muestras de EC, se observó que en IDD formaban hasta dos líneas de precipitación con el suero hiperinmune de conejo anti-EC y que estas líneas demostraban respuestas de identidad con las muestras de EC (González et al., 1991). Las corridas en poliacrilamida demostraron a su vez un péptido de 55 Kd común a todas las muestras de EC y a PVB y EPB y dos péptidos, uno de 17 Kd y otro de 9.5 Kd presentes en las muestras bovinas y en buena parte de las de EC (González, 1992). La inmunotransferencia evidenció para PVB dos péptidos de 54 y 55 Kd comunes a todas las muestras de EC ensayadas (González, 1992). Si bien las líneas de precipitación no necesariamente tienen que corresponder a antígenos virales, considerando que se emplearon costras como material antigénico y podría tratarse de proteínas celulares generadas en el proceso de infección viral y los cambios metabólicos asociados a la misma.

Los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* (IDR, ID), las relaciones antigénicas demostradas en las pruebas en gel y el origen en una misma unidad de varias de las muestras de EC y las dos muestras bovinas empleadas, soportan la tendencia a dejar de considerar tres especies del virus en rumiantes y suponer que el género parapox estaría integrado por sólo una especie viral a la que podría agregarse el parapox demostrado en mamíferos marinos (Gassmann et al., 1985; Osterhaus et al., 1990). Un elemento adicional, particularmente a partir

de las observaciones in vivo, sería evaluar al virus de origen bovino como alternativa en la profilaxis del EC de los pequeños rumiantes.

Se pudo comprobar al examinar el diferente comportamiento de distintas cepas de EC, dos de origen ovino y dos caprinas, en infecciones cruzadas sobre ovinos y caprinos, (Exp. 9), la mayor susceptibilidad de las cabras a la enfermedad, pese a tener antecedentes de haber sido expuestas al virus y evidenciar respuestas positivas a la IDR, mientras que los ovinos utilizados resultaron negativos a la misma prueba. La mayor susceptibilidad de las cabras a la enfermedad coincide con observaciones de campo (Bourghton y Hardy, 1934; Tórtora, 1985) y experimentales (Hussain y Burger, 1989). Estos resultados también jerarquizan la importancia de los individuos, en el desarrollo de lesiones al desafío o en el brote natural y la posibilidad de variantes del virus de diferente virulencia para las distintas especies.

Los resultados de relación antigénica y de patogenicidad entre las distintas muestras de EC y los parapox bovinos, los obtenidos al cruzar cepas de EC de origen ovino y caprino, así como las variaciones entre las cepas de brote y las de desafío (Cuadro 5), inducen a considerar las posibilidades de modificación génica de estos virus al adaptarse a las especies que infectan, transmitirse en el rebaño y modificarse de acuerdo a la inmunidad del rebaño en que se establecen, como ya se ha demostrado en poblaciones vacunadas (Moens et al., 1990) y en acuerdo con las diferencias anotadas

por quienes han evaluado el genoma de este género viral y sus asociados, punto 1.1.8., (Rafii y Burger, 1985; Gassmann et al., 1985; Robinson et al., 1987; Gershon et al., 1989), aunque la información disponible no permite adelantar una hipótesis sobre el mecanismo molecular involucrado en el proceso, la posibilidad de recombinación génica, aparece como una de las alternativas de mayor interés para explicar estos cambios (Gershon et al., 1989)

Los distintos trabajos realizados permiten considerar a la prueba de IDR como un instrumento útil para demostrar rebaños, lotes de animales y eventualmente animales que han padecido la enfermedad, han estado expuestos sin enfermar clínicamente y aparentemente incluso animales en proceso de incubación (Exp. 6). Se demostraron sin embargo, animales falsos negativos (Exps. 4 y 5 por lo que la prueba no resulta recomendable en animales individuales, excepto para detectar animales positivos. La prueba de IDR tampoco es indicativa de la presencia de una respuesta inmune protectora (Exps. 7 y 8). Los ensayos realizados también evidenciaron su especificidad (corderos Exp.5) y sensibilidad considerando que aún en diluciones 10^1 , 10^2 , y 10^3 , la prueba continuó siendo positiva (Exp. 7). Es conveniente señalar, que no existe información en la literatura, y no fue evaluada en este trabajo la posibilidad de que los resultados de la prueba de IDR puedan modificarse en sucesivas aplicaciones del antígeno, en términos de sensibilizar o por el contrario desensibilizar a los animales evaluados.

- Los resultados obtenidos al evaluar el antígeno inactivado con calor, UV y formalina (Exp. 4) sugieren que el resultado de la prueba depende fuertemente de la integridad de la partícula, para que la presentación antigénica sea adecuada.

Los resultados de este trabajo demostraron la posibilidad de la existencia de animales expuestos e infectados sin que hubieran desarrollado lesiones, portadores potenciales del virus, en los ovinos de la FES-C; razonables evidencias de que el período de incubación de la enfermedad en condiciones naturales, puede ser más amplio que el postulado a partir de infecciones experimentales; diferencias importantes en el comportamiento de corderos y cabritos en el desarrollo de lesiones al desafío experimental; así como en la susceptibilidad de estas especies al virus. Sin embargo la información disponible abre aún un extenso espectro de posibles explicaciones a estas observaciones, sin poder llegar a una propuesta definitiva que las explique. El examen ultraestructural de células infectadas, *in vivo* e *in vitro*, abre posibilidades en este sentido; pero es probable que el uso de técnicas que permitan poner en evidencia material genético del virus en tejidos infectados, aporten por su sensibilidad, información de mayor relevancia. El uso de animales no castrados, especialmente cabritos, pese a los problemas de instalaciones y manejo que implican, es otra alternativa que debe examinarse a la brevedad.

Igualmente es necesario incrementar la información en torno a los mecanismos inmunes involucrados a nivel local, cutáneo, empleando marcadores inmunes que permitan identificar funcionalmente a las células presentes y que puedan apoyar las observaciones histológicas y ultraestructurales en los sitios de inoculación viral.

Finalmente serán necesarios estudios a nivel molecular en las células infectadas, que permitan establecer la posible existencia de factores permisivos o inhibitorios de la infección y multiplicación viral.

LITERATURA CITADA

- ABDUSSALAM, M. (1957a). Contagious postular dermatitis virus. II Pathological histology. *J. Comp. Path.* 67: 217-222.
- ABDUSSALAM, M. (1957B) Contagious postular dermatitis. III- Experimental infection. *J. J. Comp. Path.* 67: 305-319.
- ABU-SAMRA, M.T. & Walton, G.S. (1981). The inoculation of rabbits with *Dermatophilus congolensis* and the simultaneous infection of sheep with *D. congolensis* and orf virus. *J. Comp. Path.* 91: 317-329.
- 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.
- AGUILAR-SETIEN, A. (1980). Fréquence de la stomatite papuleuse bovine. These annexe, Fac. Méd. Vét. Univ. Liege.
- AMES, T.R.; Robinson, R. A.; O'Leary, T.P. & Fahrman, J. W. (1984). Tail lesions of contagious ecthyma associated with docking *J. Am. Vet. Med. Ass.* 184: 88-89.
- BAUTISTA, C.R. (1986). D. Obtención de la sensibilidad y la especificidad de las pruebas inmunológicas. En: "Manual de inmunología". Ed. Morilla G., A. y Bautista G., C.R. Ed. Diana, pg. 394.
- BECK, C. C. and Taylor, W. (1974). Orf: it's awful!. *VM/SAC* 69: 1413-1417.
- BOS, J.D. & Kapsenberg, M.L. (1986). The skin immune system. Its cellular constituents and their interactions. *Immunol. today* 7: 235-240.
- BOS, J.D. Kapsenberg, M.L. (1993). The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol. today* 14: 75-78.
- BOUGHTON, I.B. & Hardy, W. (1934). Contagious ecthyma (sore mouth) of sheep and goats. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 85: 150-178.
- BREATHNOCH, S.M. (1993). The skin immune system and psoriasis. *Clin. Exp. Immunol.* 91: 343-345.
- BUDDLE, B.M.; Dellers, R. & Schurig, G. (1984a). Heterogeneity of contagious ecthyma virus isolates. *Am. J. Vet. Res.* 45: 75-79.
- BUDDLE, B.M.; Dellers, R. & Schurig, G. (1984b). Contagious ecthyma virus-vaccination failures. *Am. J. Vet. Res.* 45: 263-266.

BUDDLE, B.M. & Pulford, H.D.(1984). Effect of passively-acquired antibodies and vaccination on the immune response to contagious ecthyma virus. *Vet. Microbiol.* 9: 515-522.

BUTTNER, Von M.; Strube, W.; Wolf, G & Hoerstke, M. (1987). Parapoxvirus als induktor unspezifischer Abwehrmechanismen. *Tierärztl. Umschau* 1: 14-21.

CALDERON, R. A. (1989). Immunoregulation of dermatophytosis. *C.R.C. Critical Rev. Microbiol.* 16: 339-368.

COATES, J. W. & Hoff, S. (1990). Contagious ecthyma: An unusual distribution of lesions in goats. *Can. Vet. J.* 31: 209-210.

CRUZ, A.; Cervantes O., R.A. & Tórtora P., J. (1990a). Infección simultánea en ovinos por el virus del ectima contagioso (orf) y *Dermatophilus congolensis*. III Cong. Nal. Prod. Ovina. Tlaxcala-Méx., 214-217.

CRUZ, A.; Cervantes O., R.A. & Tórtora P., J. (1990b). Diagnóstico de dermatofilia mediante pruebas serológicas en gel de agarosa: Doble inmunodifusión y contraelectroforesis. III Cong. Nal. Prod. Ovina. Tlaxcala-Méx., 218-220.

EDELSON, R.L. & Fink, J.M. (1985). Función inmunológica de la piel. *Invest. Ciencia.* 107: 18-26.

FASSI-Fehri, M.; El-Harrak, M.; Johnson, D.; Abbadi, M. & El-Idrissi, A. (1984). Etude expérimentale de l'immunité anticlaveuse post-vaccinale, *Ann. Rech. Vét.* 15: 59-64.

GARDINER, M.R.; Craig, J. & Nairn, M. (1967). An unusual outbreak of contagious ecthyma (scabby mouth) in sheep. *Aust. Vet. J.* 43: 163-165.

GASSMANN, U.; Wyler, R. & Wittek, R. (1985). Analysis of parapoxvirus genomes. *Arch. Virol.* 83: 17-31.

GERDES, G.H.; Lugt, J.T. & Van der Lugt J.J. (1991). Electron microscopic evidence of a papillomavirus and parapoxvirus in the same lesion. *Vet. Rec.* 128: 594-595.

GERSHON, P.D.; Kitching, R.P.; Hammond, J.M: & Black, D.N. (1989). Poxvirus genetic recombination during natural virus transmission. *J.gen. Vir.* 70: 485-489.

GONZALEZ G., S.; Romero R., A. & Tórtora P., J. (1991). Relaciones antigénicas entre muestras de ectima contagioso (orf) y parapox bovinos, en inmunodifusión y contraelectroforesis. VII Reunión Nal. Caprinocultura, Monterrey Méx., 138-140.

GONZALEZ G., S. (1992). Caracterización antigénica de parapoxvirus en México. Tesis de maestría, FES-Cuautitlán, UNAM. Asesor M.C. Jorge Tórtora P.

GREIG, A.S. (1957). Contagious ecthyma of sheep. II-In vitro cultivation of the virus. *Can J. Comp. Med.* 21: 304-308.

HARKNESS, J.W.; Scott, A. & Hebert, C. (1977). Electron microscopy in the rapid diagnosis of orf. *Br. Vet. J.* 133: 81-87.

HART, L.; Hayston, J. & Keast, J. (1949). Observations on contagious pustular dermatitis of sheep. *Aust. Vet. J.* 25: 40-45.

HAWKINS, C.D.; Ellis, T.M.; Davies, M.K.; Peet, R.L. & Parkinson, J. (1991). An unusual outbreak of contagious ovine ecthyma. *Aust. Vet. J.* 68: 210-211.

HOOSER, S.B.; Scherba, G.; Morin, D.E. & Whiteley, H.E. (1989). Atypical contagious ecthyma in a sheep after extensive cutaneous thermal injury, *J. Am. Vet. Med. Ass.* 195: 1255-1256.

HORGAN, E.S. & Haseeb, M. (1947). The immunological relationships of strains of contagious pustular dermatitis virus. *J. Comp. Path.* 57: 1-7.

HOUSAWI, F.M.T. & Abu-Elzein, E.M.E. (1991). Orf infection following ear tagging in goats. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays trop.* 44: 277-278.

HOWARTH, J.A. (1929). Infectious pustular dermatitis of sheep and goats. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 75: 741-760.

HUCK, R.A. (1966). A paravaccinia virus isolated from cows' teats. *Vet. Rec.* 78: 503-505.

HUNSKAAR, S. (1986). Giant orf in a patient with chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Dermatol.* 114: 631-634.

HUSSAIN, K.A. & Burger, D. (1989). In vivo and in vitro characteristics of contagious ecthyma virus isolates: Host response mechanism. *Vet. Microbiol.* 19: 23-36.

JENKINSON, D. McEwan; Mc Ewan, P.E.; Onwuka, S.K.; Moss, V.A.; Elder, H. Y.; Hutchison, G. & Reid, H.W. (1990a). The polymorphonuclear and mast cell responses in ovine skin infected with orf virus. *Vet. Dermatol.* 1: 71-77.

JENKINSON, D. Mc Ewan; Mc Ewan, P.E.; Onwuka, S.K.; Moss, V.A.; Elder, H.Y.; Hutchison, G. & Reid H.W. (1990b). The pathological changes and polymorphonuclear and mast cell

responses in the skin of specific pathogen-free lambs following primary and secondary challenge with orf virus. *Vet. Dermatol.* 1: 139-150.

JENKINSON, D. Mc Ewan; Mc Ewan, P.E.; Moss, V.A.; Elder, H.Y. & Reid, H.W. (1990c). Location and spread of orf virus antigen in infected ovine skin, *Vet. Dermatol.* 1: 189-195.

JENKINSON, D. Mc Ewan; Hutchison, G.; Onwuka, S.K. & Reid, H.W. (1991). Changes in the MHC class II+ dendritic cell population of ovine skin in response to orf virus infection. *Vet. Dermatol.* 2: 1-9.

JENSEN, R. & Swift, B.L. (1982). *Diseases of sheep* (2nd. edition). Ed. Lea & Febiger.

KATITCH, R.V. (1979). Les problemes de l'etiologie et de l'immunoprophylaxie dans le pietin du mouton. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 2: 55-59.

KERRY, J.B. & Powell, D.G. (1971). The vaccination of young lambs against contagious pustular dermatitis. *Vet. Rec.* 88: 671-672.

KITCHING, R.P. & Taylor, W.P. (1985). Transmission of capripoxvirus. *Res. Vet. Sci.* 39: 196-199.

LEAVELL, U.; Mc Namara, M.; Muelling, R.; Talbert, W.; Rucker, R. & Dalton, A. (1968). Orf. Report of 19 human cases with clinical and pathological observations. *J. Am. Med. Ass.* 204: 109-116.

LARD, S.L.; Roehrig, J.T. & Pearson, L.D. (1991). Differentiation of parapoxviruses by application of orf virus-specific monoclonal antibodies against cell surface proteins. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28: 247-258.

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. Vét.* 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.

LIVINGSTON, C.W. & Hardy, W. (1960). Longevity of contagious ecthyma virus. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 137: 651.

MAHNEL, von H. & Munz, E. (1987) Zur derzeitigen epizootologischen Lage bei den Tierpocken. *Tierärztl. Umschau* 1: 5-14.

MATTHEWS, R.E.F. (1979). Classification and nomenclature of viruses. Third report of the International Committee on Taxonomy of viruses. Intervirology. 12: 132-296.

MAYR, A. (1980). Desarrollo de nuevos procedimientos de inmunización y paraimunización en medicina veterinaria. El libro azul (Hoechst) 17: 478-494.

McKEEVER, D. (1984). Persistent orf. Vet. Rec. 115: 334-335.

McKEEVER, D.J. & Reid, H.W. (1987). The response of the supramammary lymph node of the sheep to secondary infection with orf virus. Vet. Microbiol. 14: 3-13.

McKEEVER, D.J.; Reid, H.W.; Inglis, N.f. & Herring, A.J. (1987). A qualitative and quantitative assessment of the humoral antibody response of the sheep to orf virus infection. Vet. Microbiol. 15: 229-241.

McKEEVER, D.U.; Jenkinson, D. McEwan; Hutchison, G & Reid, H.W. (1988). Studies of the pathogenesis of orf virus infection in sheep. J. Comp. Path. 99: 317-328.

MITCHNER, M.B. (1969). The envelope of vaccinia and orf viruses: an electron-cytochemical investigation. J. gen. Virol. 5: 211-220.

MOENS, V.; Wold, I.; Mathiesen, S.D.; Jorgensen, T.; Sorensen, D. & Traavick, T. (1990). Parapoxvirus papillomatosis in the Muskoxen (*Ovibos moschatus*): Genetical differences between the virus causing new outbreak in a vaccinated herd, the vaccine virus and a local orf virus. Acta Vet. scand 31: 17-25.

MOHANTY, P.K. & Rai, A. (1989). Immune response induced by vero cell culture adapted buffalo pox virus in rabbits and buffaloes. Indian J. Exp. Biol. 27: 350-355.

MORALES, G.A. & Van Kruiningen, H. (1971). Contagious ovine ecthyma with primary lesions of the rumen and concurrent phycocytosis: A case report. Am. J. vet. Res. 32: 163-166.

MORILLA G., A. (1989). Hipersensibilidad tipo I, II, III y IV. En: "Inmunología veterinaria". Ed. Morilla, A., Cap. 1, pg. 50-52.

MUNZ, E. (1976). Double infection of sheep and goat in Kenya with orf virus and *Dermatophilus congolensis*. En: "Dermatophilus infection in animals and man" Ed. Lloyd, D.M. & Sellers, K.C. Acad. Press. London, 57-66.

MUNZ, E.; Gutner, T. & Hubschle, O.J.B. (1991). Orf infection among Boer goats in Namibia. Tierärztl. Umschau 46: 86-93.

- NAGINGTON, J. & Whittle, C. (1961). Human orf. Isolation of the virus by tissue culture. *Br. Med. J.* 2: 1324-1327.
- NAGINGTON, J.; Newton, A. & Horne, R. (1964). The structure of orf virus. *Virol.* 23: 461-472.
- 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. (1968). The growth of paravaccinia viruses in tissue culture. *Vet. Rec.* 82: 477-482.
- NFI, N.A. (1991). Soremouth in sheep and goats at the Mankon Animal Research Station, Cameroon. *Rev. Elev. Med. Vet. Paystrop.* 44: 141-142.
- 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.
- OSTERHAUS, A.D.M.E.; Broeders, H.W.J.; Visser, I.K.G.; Teppema, J.S. & Vedder, E.J. (1990). Isolation of an orthopoxvirus from pox-like lesions of a grey seal (*Halichoerus grypus*). *Vet. Rec.* 127: 91-92.
- PAPADOPOULUS, O.A.; Dawson, P.; Huck, R. & Stuart, P. (1968). Agar gel diffusion studies of paravaccinia viruses. *J. Comp. Pathy.* 78: 219-225.
- PEKELDER, J.J.; Talmon, F. & Boer, M. (1980). Ecthyma, a known disease of which little is known. *Tijdschr. Diergeneesk.* 105: 232-239.
- PETERS, D.; Müller, G. & Büttner, D. (1964). The fine structure of paravaccinia viruses. *Virol.* 23: 609-611.
- PLOWRIGHT, W.; Witcomb, M. & Ferris, R. (1959). Studies with a strain of contagious pustular dermatitis virus in tissue culture. *Arch. ges. Virusforsch.* 9: 214-231.
- PODESTA, M.; Mendoza, L. & Jimnez, C. (1984). Doble infección en ovinos de Costa Rica, causada por *Dermatophilus congolensis* y virus del ectima contagioso (orf). *Ciencias Veterinarias* 6: 17-23.

- 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.
- PYW, D. (1990). Vaccination of sheep with cell culture grown orf virus. Aust. vet. J. 67: 182-186.
- RAFFI, F. & Burger, D. (1985). Comparison of contagious ecthyma virus genomes by restriction endonucleases. Arch. Virol. 84: 283-289.
- RAMYAR, H. (1973). Etude sur la possibilite du controle de l'ecthyma contagieux a l'aide d'un virus vaccin prepare su cultures cellulaires. Arch. Inst. Razi 25: 5-7.
- RIVERA, H.; Madewell, B.R. & Ameghino, E. (1987). Serologic survey of viral antibodies in the peruvian alpaca (Lama pacos). Am .J. vet. Res. 48: 189-191.
- 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 lesions or orf in sheep. Arch. Virol. 71: 43-55.
- ROBINSON, A.J. & Petersen, G.V. (1983). Orf virus infection of workers in the meat industry. N.Z. Med. J. 96: 81-85.
- ROBINSON, A.J.; Barns, G.; Fraser, K.; Carpenter, E. & Mercer, A.A. (1987). Conservation and variation in orf virus genomes. Virol. 157: 13-23.
- RODRIGUEZ, B.; Correa, P.; Trigo, F.; Mercado, M.; Madrid, J. & Hernández, P. (1979). Ectima contagioso de los borregos en México. VII Reunión de Provincia de Microbiología (Asoc. Mex. Microbiol.). 52.
- ROMERO-MERCADO, C.H.; McPherson, E.A.; Laing, A.; Lawson, J. & Scott, G. (1973a). Virus particles and antigens in experimental orf scabs. Arch. ges. Virusforsch. 40: 152-158.
- ROMERO-MERCADO, C.H.; McPherson, E.A.; Laing, A.; Lawson, J. & Scott, T. (1973b). Virus particles and antigens in natural orf. Arch. ges. Virusforsch. 40: 159-160.
- ROSSI, G.A. (1973) Adaptation of the virus of contagious ecthyma to cellular substrates of avian origin. Vet. Italian. 24: 218-22.

SAMUEL, W.M.; Chalmers, G.; Stelfox, J.; Loewen, A. & Thomsen, J. (1975). Contagious ecthyma in bighorn sheep and mountain goat in Western Canada. *J. Wildl. Dis.* 11: 26-31.

SANCHEZ, R.L.; Hebert, A.; Lucía, H. & Swedo, J. (1985). A case report with histologic, electron microscopic and immunoperoxidase studies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 109: 166-170.

SAVAGE, J. & Black, M. (1972) "Giant" orf of finger in a patient with a Lymphoma. *Proc. Roy. Soc. Med.* 65: 766-768.

SAWHNEY, A.N. (1966). Studies on the virus of ecthyma contagiosum. III Multiplicity of virus strains. *Acad. Bulgare Sci. Bull. Inst. Microbiol.* 18: 179-183.

SAWHNEY, A.N. (1972). Studies on the virus of contagious pustular dermatitis physico-chemical properties. *Indian Vet. J.* 49: 14-19.

SCHNURRENBERGER, P.R.; Swango, L.T.; Bowman, G.M. & Luttgen, P.J. (1980). Bovine papular stomatitis incidence in veterinary students. *Can. J. comp. Med.* 44: 239-243.

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 P., J. (1985). Ectima contagioso en ovinos y caprinos. Tesis de maestría. FES-Cuautitlán, UNAM. Asesor Dr. Eliseo Hernández B.

TORTORA P., J. & García J.; C. (1987). Relaciones antigénicas entre diferentes muestras de ectima contagioso (orf) de México. *Tec. Pec. Méx.* 25: 32-40.

TORTORA P., J. (1987). Demostración de pseudoviruela bovina (nódulo del ordeñador) en vacas lecheras de México. *Tec. Pec. Méx.* 25: 119-127.

TRUEBLOOD, M.S. & Chow, T. (1963). Characterization of the agents of ulcerative dermatosis and contagious ecthyma. *Am. J. vet. Res.* 24: 47-51.

TRUEBLOOD, M.S. (1966). Relationship of ovine contagious ecthyma and ulcerative dermatosis. *Cornell. Vet.* 56: 521-526.

VALDER, W.A.; Straub, O.; Thiel, W.; Wachendörfer, G. & Zettl, K. (1979). Ecthyma contagiosum des Schafes-Wandel des klinischen Bildes. *Tierärztl. Umschau* 34: 828-836.

VERDES, N.; Velescu, E.; Ungureanu, V. & Asiminei, S. (1989). Research into vaccination of sheep against contagious

ecthyma. Lucrarile Inst. Cercetari Vet. Bioprep. "Pasteur" 18: 81-88.

WACHENDORFER, G., & Valder, W. von (1980). Erfahrungen mit der Prophylaxe gegen Ecthyma contagiosum beim Schaf. Prakt. Tierarzt 61: 479-482.

WITTEK, R.; Kuenzle, C. & Wyler, R. (1979). High C+G content in parapoxvirus DNA. J. gen. Virol. 43: 231-234.

WITTEK, R.; Herlyn, M.; Schmpferli, D.; Bachmann, P.; Mayr, A. & Wyler, R. (1980). Genetic and antigenic heterogeneity of different parapoxvirus strains. Intervirology 13: 33-41.

YERUHAM, I.; Hadani, A.; Elad, D.; Ratner, D.; Perf. S.; Yakobspm.B. & Baranover, Y. (1991). Dermatophilosis (*Dermatophilus congolensis*) accompanied by contagious ecthyma (orf) in a flock of gaez in Israel. Israel J. Vet. Med. 46: 74-78.

YIRRELL, D.L.; Reid, H.W.; Norval, M. & Howie, S.E.M. (1989). Immune response of lambs to experimental infection with orf virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 22: 321-332.

YIRRELL, D.L.; Reid, H.W.; Norval, M.; Entrican, G. & Miller, H.R.P. (1991a). Response of efferent lymph and popliteal lymph node to epidermal infection of sheep with orf virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 28: 219-235.

YIRRELL, D.L.; Reid, H.W.; Norval, M. & Miller, H.R.P. (1991b). Qualitative and quantitative changes in ovine afferent lymph draining the site of epidermal orf virus infection. Vet. Dermatol. 2: 133-141.

ZARNKE, R.L. & Dieterich, R.A. (1985). Attempted reactivation of contagious ecthyma in Dall Sheep. Am. J. vet. Res. 46: 1775-1776.

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.