



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Estudio de diferentes rutas de inoculación del virus orf
para la inducción experimental del Ectima Contagioso en corderos

Study of different inoculation routes of the orf virus for the
experimental induction of contagious ecthyma in lambs

Autor/es

María Cuadra Coronado

Director/es

Dr. Aurora Ortín Pérez

Facultad de Veterinaria

2022

Índice

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Etiología	5
1.2 Patogenia	6
1.2.1 Factores de virulencia y evasión del sistema inmune	6
1.2.2 Epidemiología, zoonosis y métodos de transmisión	7
1.3 Signos clínicos	8
1.4 Diagnóstico	9
1.4.1 Diagnóstico clínico	9
1.4.2 Diagnóstico anatomopatológico	10
1.4.3 Diagnóstico molecular	10
1.4.4 Diagnóstico serológico	10
1.4.5 Otros métodos diagnósticos	11
1.5 Tratamiento, prevención y control	11
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	12
3. METODOLOGÍA	14
3.1 Animales	14
3.2 Infección experimental con el virus orf	15
3.2.1 Cultivo in vitro del virus orf	15
3.2.2 Infección experimental mediante inoculación intradérmica	15
3.2.3 Infección experimental mediante inyección subcutánea	16
3.2.4 Infección experimental mediante escarificación	17
3.3 Estudio de la evolución clínica de la enfermedad	18
3.4 Pruebas laboratoriales	18
3.5 Necropsias y estudio histopatológico	19
3.6 Análisis estadístico y representación de datos	19
4. RESULTADOS	20
4.1 Signos clínicos	20
4.2 Pruebas laboratoriales	22
4.2.1 Análisis hematológico	22
4.2.2 Detección de anticuerpos frente al virus orf	22
4.2.3 Determinación de la carga viral mediante qPCR	22
4.3 Necropsias y estudio histopatológico	24
4.3.1 Infección intradérmica (Grupo 1)	24
4.3.2 Infección subcutánea (Grupo 2)	26
4.3.3 Infección por escarificación (Grupo 3)	27
4.4 Lesiones desarrolladas tras la infección. Análisis estadístico	28
4.4.1 Tipos de lesiones	29
4.4.2 Número total de lesiones	31
4.4.3 Tiempo hasta la aparición de la primera lesión	32
4.4.4 Gravedad de las lesiones	33
5. DISCUSIÓN	35
5.1 Desarrollo de EC y estudio estadístico	35
5.2 Estudio histopatológico	36
6. CONCLUSIONES	38
7. VALORACIÓN PERSONAL	40
8. BIBLIOGRAFÍA	41

RESUMEN

El Ectima Contagioso (EC) es una enfermedad causada por el virus orf (ORFV), un parapoxvirus muy resistente en el ambiente que es capaz de regular la respuesta inmunitaria del hospedador favoreciendo la aparición de infecciones secundarias. Afecta fundamentalmente a ovinos y caprinos causando pápulas, vesículas, pústulas, costras y lesiones proliferativas en la boca, labios, mamas y pezuñas de los animales.

Actualmente, en España y en muchos otros países, no se dispone de la vacuna para esta enfermedad (vacuna de virus vivo) y el tratamiento implica prácticas de higiene estándar y el uso de antibióticos para el control de las infecciones secundarias, cuando estas se producen, aumentando el riesgo de aparición de resistencias a los antimicrobianos. Con el fin de mejorar el bienestar de los animales afectados y controlar la diseminación del virus es necesario investigar la utilización de tratamientos alternativos. Para evaluar la eficacia de estos, se requiere encontrar métodos de infección experimental que aseguren un desarrollo de lesiones similar en todos los animales inoculados, reduciendo así el número de animales necesario para realizar los ensayos clínicos y la heterogeneidad entre los grupos sometidos a estudio.

En este trabajo, testamos tres vías de administración diferentes para la infección experimental de corderos con el virus orf: inoculación intradérmica, escarificación e inyección subcutánea en los labios. El objetivo fue observar la evolución de la enfermedad y comparar la aparición y desarrollo de lesiones en los corderos, en función de la vía de administración del virus. Tras el estudio, se concluyó que mediante la vía de inoculación intradérmica es posible reproducir la enfermedad de forma homogénea en todos los animales provocando lesiones típicas de EC con una gravedad similar a la desarrollada mediante escarificación, pero con la ventaja de poder administrar la misma dosis de inóculo a todos los animales.

ABSTRACT

Contagious Ecthyma is a disease caused by the orf virus (ORFV), a parapoxvirus very resistant in the environment that is capable of regulating the immune response of the host favoring the appearance of secondary infections. It mainly affects sheep and goats causing papules, vesicles, pustules, scabs and proliferative lesions in the mouth, lips, udders and hooves of the animals.

Nowadays, in Spain and in many other countries, the vaccine for this disease (live vaccine) is not available and treatment involves standard hygiene practices and the use of antibiotics for the control of secondary infections, when they occur, increasing the risk of antimicrobial resistance. In order to improve the welfare of affected animals and control the spread of the virus, it is necessary to investigate the use of alternative treatments. To evaluate the efficacy of these, it is necessary to find experimental infection methods that ensure similar lesion development in all inoculated animals, thus reducing the number of animals needed to perform clinical trials and the heterogeneity among the groups under study.

In this work, we tested three different routes of administration for the experimental infection of lambs with the orf virus: intradermal inoculation, scarification and subcutaneous injection in the lips. The objective was to observe the evolution of the disease and to compare the appearance and development of lesions in the lambs, depending on the route of administration of the virus. After the study, it was concluded that by the intradermal inoculation route it is possible to reproduce the disease homogeneously in all animals causing typical lesions with a similar severity to that developed by scarification, but with the advantage of being able to administer the same dose of virus to all animals.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Etiología

El Ectima Contagioso (EC) es una enfermedad causada por un virus ADN denominado virus orf (ORFV). Este virus es la especie prototipo del género Parapoxvirus de la familia Poxviridae. Los poxvirus son un grupo complejo de virus. Es el grupo más numeroso de todos los grupos virales. Gracias a ciertas enzimas específicas se replican más en el citoplasma que en el núcleo de las células, diferenciándose así de la mayoría de los otros virus ADN. Las partículas virales son asimétricas y presentan forma de ladrillo con esquinas redondeadas y son muy resistentes a la inactivación química y física (Fleming et al., 2015). Originalmente, los poxvirus se clasificaron según su capacidad de producir lesiones cutáneas vesiculosas o cuerpos de inclusión citoplasmáticos. Desde 1966, con el establecimiento del Comité Internacional para la Nomenclatura de los Virus, su clasificación se ha basado en la forma grande del virión y la presencia de una gran molécula lineal única de ADN de doble cadena. La clasificación aceptada de los poxvirus de los vertebrados es la siguiente:

Tabla 1: Clasificación de los poxvirus de los vertebrados. Familia: Poxviridae; subfamilia: Chordopoxviridae (Mathews, 1984)

Género	Virus prototipo
<i>Orthopoxvirus</i>	Viruela, vaccinia, cowpox, monkeypox
<i>Parapoxvirus</i>	Orf, seudoviruela, virus de la estomatitis papular bovina
<i>Avipoxvirus</i>	Viruela aviar
<i>Capripoxvirus</i>	Virus de la viruela ovina
<i>Leporipoxvirus</i>	Virus del mixoma
<i>Yatapoxvirus</i>	Tanapoxvirus, tumor del mono de Yaba
<i>Molluscipoxvirus</i>	Virus del molusco contagioso
<i>Suipoxvirus</i>	Virus de la viruela porcina

Los parapoxvirus están relacionados antigénica y genéticamente y tienen una morfología, una organización genómica y un mecanismo de virulencia similares (Fleming et al., 1993). Los genes comunes se encuentran en la región central mientras que los genes variables están en los extremos terminales (Mercer et al., 2002). En la región central se encuentran los genes esenciales para la replicación del ADN y la producción de partículas víricas en el citoplasma de las células infectadas, mientras que los genes terminales participan en la patogénesis viral. Estos últimos tienden a no ser específicos del género, sino de la especie, y codifican factores de

virulencia y proteínas que interactúan con componentes del sistema inmunitario del huésped (Mercer and Haig, 1999).

Observados mediante microscopía electrónica, los viriones de los parapoxvirus tienen una forma ovoide característica y presentan una estructura en forma de túbulo que se enrolla alrededor de la partícula viral (Figura 1). Además, en comparación con otros miembros de la familia poxvirus, los parapoxvirus tienen genomas relativamente pequeños, con un alto contenido de guanina y citosina (G+C alrededor del 64%) que sugiere divergencia significativa de otros géneros de esta familia (Delhon et al., 2004).

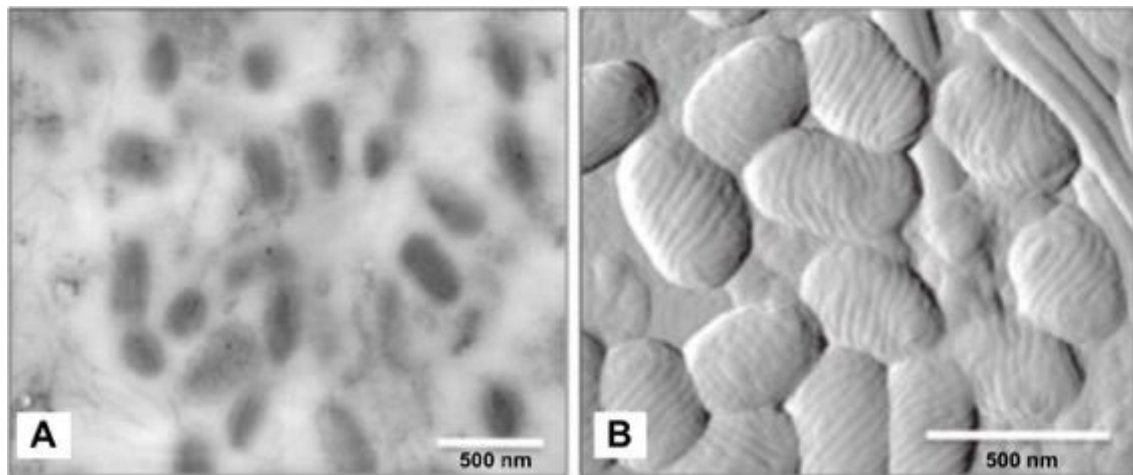


Figura 1. Microscopía electrónica del ORFV. (A) Viriones maduros intracelulares. Microscopía electrónica de transmisión. (B) Viriones extracelulares. Microscopía de fuerza atómica. (Extraído de Li et al., 2012).

1.2 Patogenia

1.2.1 Factores de virulencia y evasión del sistema inmune

El virus orf puede persistir en un rebaño durante mucho tiempo debido a su gran estabilidad en el ambiente, ya que es resistente a la desecación y sobrevive en las costras durante muchos meses. Son susceptibles los ovinos y caprinos de cualquier edad, pero la enfermedad se observa sobre todo en animales menores de un año, ya que los animales adultos de explotaciones afectadas de ectima contagioso suelen estar inmunizados por una exposición previa. La repetición de los brotes en cada estación, cuando hay animales jóvenes susceptibles, se explica por la contaminación del campo con las costras y por el contacto con animales infectados. Los pastos duros que traumatizan el epitelio de la boca facilitan la penetración del virus y la infección. (Acha and Szyfres, 2003).

El virus del Ectima Contagioso es un virus epiteliotropo que se replica de forma localizada en las células epidérmicas y en los queratinocitos. La epidermis es la primera barrera que los patógenos tienen que salvar antes de poder entrar en el organismo. Además, los queratinocitos liberan citocinas inhibitorias que neutralizan patógenos y, cuando hay daños, favorecen la inflamación y activan las células de Langerhans, las cuales son células de la epidermis presentadoras de antígenos. Sin embargo, este virus consigue evadir el sistema inmunitario (Fleming et al., 2015).

Se ha observado que el virus orf suele infectar y replicarse repetidamente en las ovejas a pesar de haberse recuperado de una primera infección. Este fenómeno es debido a que el virus posee mecanismos para interferir con los componentes de la respuesta inmune, tal y como confirma el descubrimiento de varios genes de virulencia inmunomoduladores (Alcami and Smith, 1997). Los genes de virulencia importantes del virus orf son:

- Gen que codifica una proteína similar al factor de crecimiento endotelial de los mamíferos (VEGF): Este tiene efectos mitógenos en las células endoteliales vasculares. Parece probable que la amplia proliferación capilar, la dilatación e hinchazón dérmica característica de las lesiones del virus orf sea un efecto directo de la actividad de este gen. Sin embargo, no está claro cómo la actividad de este gen podría ser una ventaja para el virus, pero podría aumentar el flujo de metabolitos esenciales para el virus, inhibir la apoptosis proveyendo al virus de más células diana o inducir indirectamente la proliferación epitelial (Lyttle et al., 1994).
- Gen que codifica un ortólogo de la citocina IL-10: regula a la baja la respuesta inmunitaria mediada por las células T alterando la función de las células presentadoras de antígenos. Es antiinflamatoria y evita la eficacia de la respuesta inmunitaria del huésped hacia las células epidérmicas infectadas por el virus (Fleming et al., 1997).
- Gen de resistencia al interferón (OVIFNR): función de resistencia al interferón, lo que es una clara indicación de que el interferón desempeña un papel fundamental en la resistencia del hospedador a la infección (Haig and Mercer, 1998).
- Gen que inhibe la citocina inflamatoria factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF): posiblemente implicado en el reclutamiento y desarrollo de las células dendríticas en la piel de las ovejas. Sin embargo, esto sigue siendo objeto de investigación. (Haig and Mercer, 1998).

1.2.2 Epidemiología, zoonosis y métodos de transmisión

El Ectima Contagioso afecta sobre todo a rumiantes domésticos y salvajes, como ovejas, cabras, ciervos, antílopes, ciervos, bueyes almiscleros etc. Otras especies permisivas son las alpacas, los

camellos y otros camélidos, los perros y, ocasionalmente, los seres humanos (Adedeji et al., 2018).

El virus se encuentra en todo el mundo y es más frecuente a finales del verano, en otoño y en invierno en los pastos y en los cebaderos. Los animales jóvenes son más susceptibles a la enfermedad que los animales adultos. El virus es estable en entornos secos y puede sobrevivir durante meses o incluso años, aunque su resistencia en el medio ambiente disminuye en condiciones de frío y humedad (Wilson et al., 2002).

El virus suele permanecer estable en la piel y lana varios meses después de que los animales afectados se hayan recuperado de la enfermedad. La vía de transmisión es horizontal por contacto directo o indirecto. Los animales pueden infectarse a través de la piel lesionada tras un corte o una abrasión y por el contacto físico con animales clínicamente afectados, portadores subclínicos y fómites como materiales de granja contaminados. Algunos animales pueden no tener lesiones visibles, pero pueden seguir transmitiendo el virus (Zhang et al., 2016).

Experimentalmente, el virus es fácilmente transmisible al escarificar los labios o la mucosa bucal de un animal sano con una emulsión de costras de un caso infectado. (Tryland et al., 2013)

Como hemos comentado anteriormente, el virus orf puede afectar al hombre por lo que es un patógeno zoonótico, aunque con escasa incidencia. Esta zoonosis se produce en personas en estrecho contacto con animales enfermos (pastores, trabajadores de mataderos, médicos veterinarios, carniceros, esquiladores). Las lesiones en el hombre son similares a las observadas en el animal infectado, aunque más leves y aparecen a los 3 a 7 días tras la infección. Pueden persistir durante semanas y ser dolorosas y pruriginosas, se localizan en los sitios de contacto, principalmente manos y brazos. A veces, estas lesiones se describen como notablemente granulomatosas y pueden demorar meses en curar (Mandell et al., 2002).

1.3 Signos clínicos

La sintomatología clínica en los ovinos y caprinos suele bastar para el establecimiento del diagnóstico ya que la enfermedad se caracteriza por causar lesiones pustulosas proliferativas inflamatorias multifocales que afectan mayoritariamente a la piel de labios, hocico, nariz, mucosa oral y a veces a los párpados (Figura 2). Además, la infección de la cavidad bucal de las ovejas ocasiona una estomatitis erosiva que afecta a las encías, paladar y la lengua. Aunque es menos frecuente la infección puede afectar también a los genitales, las ubres y las extremidades de los animales (Acha and Szyfres, 2003).

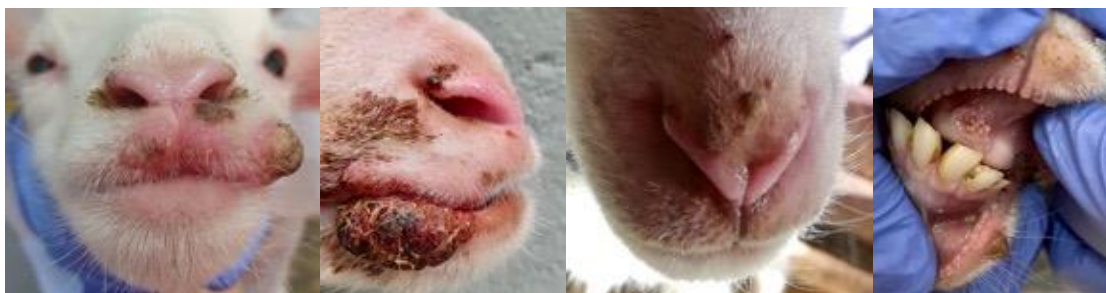


Figura 2. Signos clínicos típicos de la infección por virus orf en ovejas. Lesiones cutáneas proliferativas alrededor de la boca, las fosas nasales y la cavidad bucal. Imágenes proporcionadas por el SCRUM

Las lesiones se establecen y evolucionan a través de varias etapas, desde la mácula hasta la pápula, vesícula, pústula y formación de costras (Fleming et al., 2015). Estas lesiones se resuelven en aproximadamente 6-8 semanas. La morbilidad puede ser alta pero la mortalidad es baja. Sin embargo, el lugar de la lesión es normalmente vulnerable a una infección bacteriana secundaria. Cuando la infección viral cohabita con una infección bacteriana secundaria, como estafilococos o estreptococos, la tasa de mortalidad puede acercarse al 15% especialmente en corderos y cabritos de explotaciones con condiciones higiénicas deficientes (Ovejero, 2006). Las dolorosas costras en la boca y los labios suelen impedir a los animales infectados alimentarse adecuadamente pudiendo provocar una grave pérdida de peso corporal (Bala et al. 2018).

1.4 Diagnóstico

En la actualidad, no existe una norma internacional para el diagnóstico del Ectima Contagioso, basado principalmente en los síntomas clínicos típicos y en las pruebas de laboratorio para el diagnóstico. Los diagnósticos de laboratorio actuales incluyen PCR, ELISA, microscopía electrónica, histopatología y Western blotting (Wang et al., 2018).

1.4.1 Diagnóstico clínico

El Ectima Contagioso puede diagnosticarse en función de las lesiones características en las zonas anatómicas de predilección. Debe diferenciarse de otras enfermedades que cursan con lesiones similares, como la viruela ovina (con intensa reacción sistémica), la fiebre aftosa (no produce lesiones proliferativas), la dermatitis estafilocócica (pérdida de pelo, edema y necrosis severa de los párpados y zonas adyacentes), la dermatofilosis (pequeñas pústulas superficiales y rara vez causa lesiones cutáneas prominentes, excepto en corderos debilitados) y la dermatosis ulcerosa (con úlceras y costras en la piel de la cara, pies y órganos genitales (Wilson et al., 2002).

1.4.2 Diagnóstico anatomopatológico

Las lesiones cutáneas se caracterizan por numerosos nódulos multifocales a coalescentes, de base ancha, sin pelo, ulcerados y papilares. También se forman lesiones granulomatosas durante la regresión. En la necropsia, se revelan lesiones de forma irregular con congestión de la cavidad oral y del tracto respiratorio. En algunos casos, pueden encontrarse focos necróticos y úlceras en la lengua, las encías, la faringe, el rumen y el abomaso debido a una infección secundaria. A veces también se observan abscesos hepáticos. En la fase avanzada de la enfermedad, los animales afectados pueden morir debido al desarrollo de una neumonía (Nandi et al., 2011).

Las características histopatológicas de la lesión de Ectima incluyen vacuolización de queratinocitos, degeneración intersticial, marcada hiperplasia epidérmica, microinflamación en la epidermis, agregación de neutrófilos, células dendríticas, células T y células B en el tejido subcutáneo, y formación de la costra. También se observan cuerpos de inclusión eosinófilos en el citoplasma infectado, pero no en todas las fases de la infección. Hay células mononucleares infiltradas en la dermis, como fagocitos y linfocitos y polimorfonucleares, como eosinófilos. En la infección secundaria, aparece una infiltración dérmica de neutrófilos (Vikøren et al., 2008)

1.4.3 Diagnóstico molecular

Los métodos moleculares son una herramienta de gran utilidad para la detección de este virus a nivel de rebaño. Aquellos basados en técnicas de amplificación y detección del ADN viral, como la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) están entre los más usados. La ventaja de esta técnica radica en que es un método directo que es capaz de detectar el ADN viral en tejidos y fluidos del animal antes de la seroconversión. En el caso del ORFV, esta técnica está basada en la detección del gen B2L (Kottaridi et al., 2006). Otras técnicas como el Western blot también pueden ser empleadas, aunque resultan más caras y laboriosas.

1.4.4 Diagnóstico serológico

La presencia de anticuerpos neutralizantes es demostrable entre los 15 y 30 días post-infección, aunque esta comienza a declinar a los 2 meses. El método de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) pone en evidencia la presencia de anticuerpos IgG (Poulain et al. 1972). La prueba de neutralización del suero (SNT) y de fijación del complemento (CFT) suelen utilizarse para el estudio de la vigilancia serológica. Un título de ≥ 8 y ≥ 20 se considera positivo en SNT y CFT, respectivamente (Zarnke et al., 1983).

Estas pruebas sólo pueden recomendarse en animales enfermos o convalecientes.

1.4.5 Otros métodos diagnósticos

Estos métodos son más utilizados en el ámbito de la investigación.

La detección por microscopía electrónica es el método más rápido de diagnóstico y diferenciación de la infección por poxvirus en humanos y animales. Este revela la presencia de viriones característicos que permiten su identificación (Vikøren et al., 2008).

El uso de enzimas de restricción mediante el método de polimorfismo de longitud de fragmentos restringidos (RFLP) ha resultado útil para la caracterización molecular de diferentes cepas de parapoxvirus y la realización de análisis filogenéticos (Kottaridi et al., 2006).

La multiplicación del virus en cultivos celulares es un método *gold standard* adecuado para el aislamiento y la propagación de poxvirus. El problema es que suele ser lento y requiere una experiencia técnica considerable ya que, entre otras cosas, se necesitan 2-3 pases ciegos antes de que el efecto citopático sea pronunciado (Vikøren et al., 2008).

1.5 Tratamiento, prevención y control

En la actualidad no existe un tratamiento realmente eficaz frente al virus del Ectima Contagioso. Sin embargo, al ser una enfermedad autolimitante, el tratamiento sintomático con apósitos y antisépticos locales es muy útil. Las lesiones deben lavarse con una loción de KMnO₄ 1:100-1:10.000 y se recomienda la aplicación de ácido bórico 1:10 (Rao et al., 1994), de un antiséptico suave (Singari et al., 1990) o de una pomada antibiótica por vía tópica (Nandi et al., 1999). Como la contaminación bacteriana secundaria en la infección por el ORFV es frecuente, está recomendado el uso de antibióticos tópicos y sistémicos. El tratamiento paliativo está siempre indicado junto el mantenimiento de una dieta equilibrada. Ocasionalmente, el levamisol como inmunoestimulante puede estar indicado (Wilson et al., 2002).

Existen vacunas para el virus orf, por lo que es posible inocular a los corderos jóvenes con estas vacunas y evitar las pérdidas de producción asociadas a las lesiones alrededor de la boca causadas por la infección natural por el ORFV. Sin embargo, el problema reside en que son vacunas con virus vivos no atenuados y es por esto por lo que no se usan. En las lesiones generadas por la vacunación se producen virus que contaminan el medio ambiente al igual que los producidos con la infección natural. Como hemos explicado anteriormente, el virus presente en el material de la costra que se desprende del animal tras la resolución de la lesión ya sea natural o derivado de la vacuna, es relativamente resistente a la inactivación por lo que es a su vez una fuente de infección para las camadas posteriores y contribuye a la perpetuación de la enfermedad. (Kaaden et al., 1997).

Es por ello, que estas vacunas realmente no se utilizan. Sería deseable disponer de un medio de inmunización contra la infección por el virus orf que no produjese partículas víricas capaces de contaminar el medio. Esto permitiría reducir el nivel de infección en los rebaños de ovejas y en el medio ambiente, reduciendo así las infecciones. Se están estudiando diferentes formulaciones de vacunas entre las que se incluyen una vacuna de subunidades, un ORFV específicamente atenuado o un vector que exprese los genes apropiados del ORFV. La elección entre estas opciones se verá influida por el tipo de respuesta inmunitaria que se desee, si bien esa elección es actualmente difícil porque no está clara la naturaleza de la respuesta inmunitaria protectora frente a la infección por parapoxvirus (Acha and Szyfres, 2003).

Como prevención, podemos resaltar la importancia de realizar una cuarentena de los nuevos animales antes de introducirlos en el rebaño. Además, los animales enfermos deben ser separados del resto, alimentados aparte y tratados. Debe evitarse el consumo de leche de las hembras que presenten lesiones en los pezones y la ubre. Los ganaderos, veterinarios y personas con acceso a los animales deben utilizar guantes en el momento de manipular los animales enfermos ya que los humanos pueden contraer la enfermedad. Para reducir el riesgo de nuevas infecciones es necesario desinfectar adecuadamente los locales del establo e incinerar todo el material infectado procedente de los animales enfermos. Sin embargo, el ORFV es difícil de erradicar una vez que ha entrado en un rebaño (Nandi et al., 2011).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El sector ovino y caprino representa en España el 11% de la producción final ganadera teniendo en cuenta el conjunto del subsector cárnico y el lácteo. En los últimos cinco años, el censo ovino se ha estabilizado alrededor de los 15 millones de cabezas. Con la salida de Reino Unido de la Unión Europea, nuestro país es actualmente el primero en importancia de la comunidad política de derecho (MAPA, 2021).

Una parte importante del sector tiene un carácter extensivo y a pesar de los esfuerzos realizados, este sigue sufriendo debido a la escasa rentabilidad de las explotaciones, la subida de los precios de las materias primas, el descenso de consumo de la carne de cordero y el éxodo rural. La relación coste-beneficio es por lo tanto bastante ajustada y resulta imprescindible minimizar las pérdidas. La presencia de patologías en el rebaño provoca pérdidas causadas tanto por bajas en el rebaño como por una disminución de los índices productivos y encarece los costes de producción.

El Ectima Contagioso ovino es una de las enfermedades que pueden encarecer la producción de los ganaderos de pequeños rumiantes. Aunque es una enfermedad autolimitante, como las lesiones se localizan mayoritariamente en labios, boca y aberturas nasales si estas son muchas y confluentes, el dolor intenso interfiere con la alimentación de los animales afectados, que suelen ser animales jóvenes, provocando una pérdida de bienestar animal y una disminución de los índices productivos. Además, las infecciones secundarias son frecuentes y en la actualidad su control se lleva a cabo mediante el uso de antibióticos, aumentando el riesgo de aparición de resistencias a los mismos.

Con el fin de mejorar el bienestar de los animales afectados y controlar la diseminación del virus es necesario investigar la utilización de tratamientos alternativos.

Este trabajo forma parte de un estudio más amplio que aborda el análisis de la efectividad de un tratamiento anestésico y antiséptico tópico (Tri-Solfen®) para el tratamiento de las lesiones de ectima. Esta terapia proporciona una serie de ventajas sobre los enfoques actuales, siendo las más importantes la reducción del uso innecesario de antibióticos y la disminución del dolor, mejorando el bienestar animal. El objetivo es probar la efectividad del producto al aplicarlo en una fase inicial del desarrollo del proceso. Para ello resulta imprescindible recurrir a la infección experimental, ya que permite controlar el momento en que aparecen las lesiones. Disponer de un método de infección experimental que permita obtener un grado de desarrollo de lesiones similar en todos los animales que formen parte del estudio conseguiría además reducir la heterogeneidad entre el grupo tratado y el control, disminuyendo el número de animales necesarios en cada grupo.

La infección experimental con el virus orf ha sido múltiples veces reportada en la literatura y se lleva siempre a cabo mediante la escarificación de la zona inguinal o en la comisura labial y la inoculación por contacto con el inoculo viral. A pesar de que este procedimiento ha resultado exitoso a la hora de reproducir las lesiones asociadas a la enfermedad en ovino, resulta imposible asegurar la completa y correcta asunción de la misma cantidad de virus por todos los animales que se someten a infección. Por esa razón, en el presente TFG, se proponen diferentes métodos de infección experimental con el virus orf con el objetivo de asegurar una carga viral homogénea en todos los animales infectados y poder así conseguir un desarrollo de lesiones similar.

Para ello se establecieron los siguientes objetivos:

1. Inducir EC en corderos mediante la inoculación de aislados de ORFV obtenidos de casos naturales de la enfermedad en España, utilizando diferentes rutas:
 - a) Inoculación intradérmica en los labios
 - b) Inoculación subcutánea en la comisura de los labios
 - c) Escarificación en la comisura de los labios
2. Determinar si alguno de los tres procedimientos permite obtener una carga viral homogénea y un grado de desarrollo de lesiones similar en todos los animales infectados experimentalmente.

3. METODOLOGÍA

3.1 Animales

Los animales que formaron parte de este estudio procedían de un rebaño ovino de la raza Rasa Aragonesa sin brotes de la enfermedad en los últimos años. Se obtuvieron muestras de sangre de varias ovejas de este rebaño, recogidas en tubos sin anticoagulante, y tras extraer el suero se comprobó la ausencia de anticuerpos frente a ORFV mediante un test ELISA propio todavía sin patentar, diseñado en el marco de un proyecto anterior por uno de los investigadores del proyecto. Es un ELISA que utiliza péptidos y proteínas recombinantes de zonas inmunógenas determinadas a partir del genoma completo del virus orf.

Una vez confirmados los resultados negativos, se seleccionaron 9 corderos de este rebaño de 15 días de edad, que fueron crotalados con identificación individual (85, 91, 93, 95, 109, 111, 112, 113 y 117) y transportados a las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Tras pasar una semana en cuarentena, fueron finalmente trasladados a sus instalaciones definitivas en una zona aislada para evitar el contagio al resto de animales durante el experimento. Durante su estancia, los corderos fueron alimentados con leche artificial, pienso comercial y paja *ad libitum*.

Los corderos fueron distribuidos de forma aleatoria en tres grupos experimentales (3 corderos por grupo), que se mantuvieron en boxes separados y condiciones controladas durante todo el experimento para evitar la transmisión y contaminación entre grupos. En este sentido, en cada manejo era obligatorio el cambio de guantes y mono entre boxes y cada animal disponía de su propio biberón.



Figura 3. Corderos alojados en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza donde se llevó a cabo el experimento

3.2 Infección experimental con el virus orf

La infección experimental de los corderos se realizó con el virus orf obtenido mediante multiplicación en cultivos celulares y se valoraron tres vías de administración:

- a. Infección experimental mediante inoculación intradérmica.
- b. Infección experimental mediante inyección subcutánea.
- c. Infección experimental mediante escarificación.

3.2.1 Cultivo in vitro del virus orf

El virus se obtuvo macerando costras de lesiones de EC procedentes de casos naturales de la enfermedad con nitrógeno líquido e incubando el polvo resultante (aislado viral) en células KOP-R (kidney bovine) durante 4 días realizando diferentes ciclos de congelación y descongelación a menos 80°C tras los que se recogía el sobrenadante, se centrifugaba y filtraba con el fin de realizar un primer paso de purificación (Van Vloten et al., 2021). Al tercer ciclo, ya se vio que las células no morían en 24h y que el virus se adaptaba (efecto citopático). Tras la titulación, que resultó ser de 10^6 TCID₅₀/ml (TCID₅₀ siendo la cantidad de virus necesaria para destruir o producir cualquier otro tipo de efecto citopático en el 50% de las células o cultivos infectados), el virus se distribuyó en alícuotas de 1 ml que contenían 5×10^4 TCI₅₀. En cada cordero se utilizó una de estas alícuotas para realizar la infección experimental.

Por último, la presencia de virus en estos sobrenadantes se confirma mediante PCR. Es la PCR en la que se basa el kit Exopol que amplifica el gen que codifica la proteína B2L, proteína principal de la envuelta del virus orf (Hosamani et al., 2006).

3.2.2 Infección experimental mediante inoculación intradérmica

Los corderos incluidos en el grupo 1, (crotales 91, 93 y 113) fueron inoculados empleando la vía

intradérmica. Para ello se recurrió a la metodología que normalmente se utiliza para vacunar a los animales con Orf virus atenuado comercial.

La dosis la repartimos con una pistola intradérmica en un número determinado de disparos por distintas zonas de los labios. Calculamos unas 20 inoculaciones a 0.05ml cada una por animal, pero en realidad salieron algunas menos con 1 ml de inóculo.

- 091: Se le aplican 4 inoculaciones en el labio superior izquierdo, 4 en el labio inferior izquierdo, 3 en el labio superior derecho, 3 en el labio inferior derecho, 1 en la comisura labial derecha, 1 en el interior central del labio superior y 1 en el interior central del labio inferior.
- 093: Se le aplican 5 inoculaciones en el labio superior izquierdo, 5 en el labio inferior izquierdo, 3 en el labio superior derecho, 2 en el labio inferior derecho, 1 en el interior del labio superior en la zona central y 1 en el interior del labio inferior.
- 113: Se le aplican 5 inoculaciones en el labio superior izquierdo, 4 en el labio inferior izquierdo, 2 en el labio superior derecho, 3 en el labio inferior derecho, 1 en el labio superior central y 1 en el labio inferior central.



Figura 4. Infección experimental con pistola intradérmica

3.2.3 Infección experimental mediante inyección subcutánea.

Cada uno de los corderos incluidos en el grupo 2 (crotales 85, 95 y 112) fue infectado por vía subcutánea utilizando una jeringuilla con una aguja fina de 23Gx25mm. El volumen de inóculo se repartió en 5 pinchazos en la comisura labial (0.2ml en cada punto: labio superior izquierdo, labio inferior izquierdo, labio superior derecho, labio inferior derecho y zona frontal del labio inferior).

Los corderos sangraron bastante al pincharles, pudiendo perderse parte del inóculo. A simple vista parece que funcionó mejor la inoculación en el labio inferior ya que es la que menos

sangrado ocasionó y parece que se queda más superficial (se ve un cambio de color tras inocular). Por el contrario, en la zona central del labio superior es donde más sangró.



Figura 5. Infección experimental por vía subcutánea con aguja fina

3.2.4 Infección experimental mediante escarificación.

Los corderos del grupo 3 (109, 111 y 117) fueron infectados mediante escarificación en la comisura labial, siguiendo el mismo método que normalmente se utiliza para la infección experimental, en estudios de protección. Sin embargo, como se ha comentado, este método no asegura la administración de dosis idénticas del inóculo ni asegura la total asunción de este.

En este estudio se probaron papeles de lija de diferente grosor, 80 y 60 granos. Las tiras de 1cm x 3cm fueron previamente autoclavadas. Con la lija de 80 granos se procedió al raspado de los labios superior e inferior del lado izquierdo dejando una fuerte irritación y micro heridas. A continuación, se aplicó la mitad de volumen de inóculo (0,5 ml) con pipetas estériles en toda la zona lesionada. Los labios superior e inferior del lado derecho fueron raspados con la lija de 60 granos y se aplicó el volumen restante de inóculo (0,5ml) sobre la superficie lesionada. Se observó que esta lija más gruesa produce una mayor irritación de la piel, pero produce menos herida.

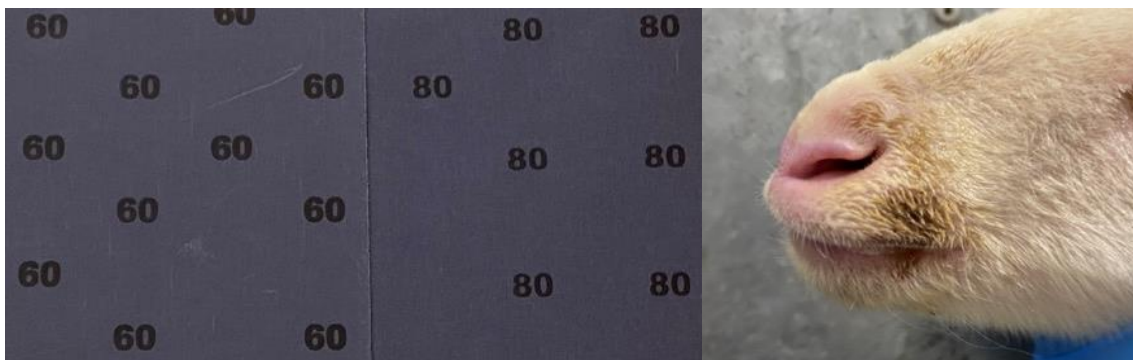


Figura 6. Infección experimental por escarificación. Papeles de lija, de 60 y 80 granos utilizados para realizar el raspado.

3.3 Estudio de la evolución clínica de la enfermedad

Tras la infección experimental los corderos fueron mantenidos durante un periodo de 20 días en el que se evaluó la evolución clínica de la enfermedad. Se realizó un examen clínico diario y fotos (de ambos lados de la cara, de frente e intrabucal) de todos los animales durante todo el periodo. Además, semanalmente, se llevó a cabo un examen clínico más pormenorizado registrando parámetros como la condición corporal, la temperatura, la frecuencia cardíaca y respiratoria y los movimientos ruminales.

3.4 Pruebas laboratoriales

Tras la infección experimental, se espera la aparición de signos clínicos a los 3-4 días post-inoculación. Como las lesiones son normalmente autolimitantes, se espera que estas remitan a los 4-5 días de su aparición.

Teniendo esto en cuenta, se obtuvieron muestras de sangre sin anticoagulante y de las zonas donde se inoculó el virus (con o sin lesiones recogidas con hisopo) en distintos momentos del periodo experimental: antes de la infección experimental (T0) y en los días 1, 5, 12 y 18 del experimento (T1 a T4). Además, también se recogieron muestras de sangre con EDTA al inicio y al final del periodo experimental (T0 y T4).

Las muestras recogidas fueron sometidas a distintos análisis laboratoriales:

- Análisis hematológico. Las muestras de sangre entera con EDTA fueron sometidas a un análisis hematológico en el laboratorio de Análisis Clínicos de la Unidad de Patología General y Médica, utilizando un contador hematológico automático Vet-ABC de la empresa DIVASA FARMAVIC.
- Determinación de la carga viral. Las muestras de hisopos fueron analizadas mediante qPCR (PCR cuantitativa) para determinar la carga viral en las lesiones. La detección específica del virus orf se realizó en los laboratorios del Instituto de Agrobiotecnología de Mutilva mediante el uso del kit comercial EXOone *Parapox* (EXOPOL S.L.) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Este Kit de PCR amplifica el gen que codifica la proteína principal de la envuelta (B2L) del ORFV (Hosamani et al., 2006). El valor Cq sirve para cuantificar la carga viral. Este representa el número de rondas de amplificación necesarias para detectar el material genético del virus. Cuanto menor es el valor Cq mayor es la carga viral y viceversa. Además, con un valor Cq superior a 38 se considera que el animal está libre de infección.

- Detección de anticuerpos en suero frente al virus orf. Las muestras de sangre sin anticoagulante fueron procesadas para obtener el suero. Los sueros fueron analizados mediante la misma técnica de ELISA para la detección de anticuerpos frente a orf descrita en el apartado 3.1.

3.5 Necropsias y estudio histopatológico.

Al finalizar el periodo de estudio, los corderos fueron eutanasiados usando una sobredosis de pentobarbital sódico inyectado por vía intravenosa. Se empleó este agente porque proporciona eutanasia rápida y humanitaria. Posteriormente, se procedió a la realización de la necropsia y toma de muestras para su estudio histopatológico.

Se cogieron muestras sistemáticamente de piel, labio, lengua, paladar, esófago y rumen, aunque no en todos los casos estos presentaban lesiones macroscópicas. Las muestras de piel se cogieron de las zonas de la cara más afectadas y sólo se cogieron muestras de pulmón si este presentaba lesiones para poder valorarlas y determinar si eran debidas a infecciones secundarias.

Una vez recogidas las muestras, estas se procesaron por el procedimiento rutinario para la realización del estudio histológico (Culling, 1974). Finalmente, se procedió a la tinción con Hematoxilina – Eosina (H & E). Esta tinción proporciona una visión en conjunto de las estructuras de un tejido o de una lesión basándose en la afinidad ácido-base de los colorantes con las diferentes estructuras celulares.

El estudio histopatológico se apoyó en la consulta de varios artículos científicos (Nandi et al, 2011, Requena et al. 2010) y el volumen 1 del libro Pathology of Domestic Animals (Jubb et al. 2016). Posteriormente, se realizó una clasificación de las lesiones observadas en función de la vía de infección, la gravedad y el número de órganos afectados para poder compararlas.

3.6 Análisis estadístico y representación de datos

Los hallazgos encontrados en las exploraciones y los resultados de los análisis realizados en las muestras recogidas a lo largo del experimento fueron agrupados en una tabla Excel para poder llevar a cabo un análisis estadístico de la evolución de la enfermedad. En esta tabla también se incluyeron las lesiones de ectima desarrolladas por los corderos, codificadas en función de su gravedad y tipo de lesión. Como se ha comentado anteriormente, las lesiones se establecen y evolucionan a través de varias etapas, desde la mácula hasta la pápula, vesícula, pústula y

formación de costras. Para simplificar este análisis, se han clasificado las lesiones en dos categorías vesícula/pústula o costra. Se tuvo en cuenta el número de órganos afectados (lengua, encías, extremidades, labio etc.) para valorar la gravedad.

Para realizar este análisis estadístico de los datos, se usó el programa IBM SPSS Statistics 26.0. La aplicación e interpretación de los test estadísticos se realizó de acuerdo con Petrie y Watson (2013). La comparación entre grupos para tipo y gravedad de lesión (variables cualitativa y ordinal, respectivamente) se ha realizado mediante el test de chi cuadrado de Pearson. Para la comparación entre grupos del número de lesiones por individuo se ha utilizado la prueba de Kruskal–Wallis (no paramétrica). El estudio del tiempo hasta la aparición de la primera lesión se ha realizado mediante análisis de supervivencia (método de Kaplan-Meier) y la comparación entre grupos se ha realizado mediante la prueba de Breslow. La relación entre variables cuantitativas (número de lesiones por individuo y número de ciclos de PCR) se ha analizado mediante el coeficiente Rho de Spearman. Se ha utilizado el Anova (análisis de varianza) para la comparación entre grupos del número de ciclos de PCR (variable cuantitativa). En el caso de comparaciones múltiples, se ha aplicado la corrección de Bonferroni. En todos los casos, valores de $p < 0,050$ se consideraron como significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Signos clínicos

La infección se realizó el día 24/02/2022 y los primeros días, la piel se apreciaba rosada y reactiva en el lugar de inoculación. Las primeras lesiones aparecieron 5 días después, el día 01/03/2022. Todos los corderos infectados por las vías intradérmica y escarificación presentaron lesiones a los 5 días post-infección (P.I). A los 7 días P.I, el cordero 85 del grupo infectado por la vía subcutánea presentó una lesión única en el labio inferior. Este animal no desarrolló ninguna lesión más y ninguno de los otros dos corderos de este grupo presentó lesiones en los 20 días que duró el experimento.

Las vesículas y pápulas tardaron en convertirse en costras entre 3 y 7 días dependiendo de la extensión y localización de las lesiones.

En los corderos inoculados mediante escarificación se observaron los labios elevados, lo que indica un crecimiento proliferativo del tejido, característico de la infección por el virus orf. Las lesiones se extendieron desde el lugar de inoculación (comisuras), desarrollándose como un proceso proliferativo grande y coalescente. La zona reactiva tenía una anchura de unos 1-1,5cm,

sin lesiones abiertas, pus u otros indicios de infecciones bacterianas secundarias en el lugar de la inoculación.



Figura 7. Lesiones de EC en los corderos inoculados mediante escarificación

Las lesiones de los corderos inoculados intradérmicamente fueron más localizadas. Se desarrollaron en los puntos de inoculación en los labios, aunque también se extendieron a otras partes de la cavidad bucal como las encías, el paladar o la lengua. En este caso, sí que se visualizan zonas con pus, indicativo de una posible infección bacteriana secundaria.



Figura 8. Lesiones de EC en los corderos inoculados por la vía intradérmica

Para interpretar los valores obtenidos en las exploraciones clínicas de los animales, consideramos como normales los valores de temperatura comprendidos entre 38-40°C, los de la frecuencia cardiaca entre 80-100 lpm y los de la frecuencia respiratoria entre 36-48 rpm (Ramos y Ferrer, 2007).

En la tabla 2, observamos que todos los animales presentaron taquicardia en todas las exploraciones clínicas, aunque este hecho podemos atribuirlo al estrés producido por el manejo. También se produjo puntualmente alguna diarrea ligera debido seguramente al cambio o desequilibrio de la alimentación (leche/pienso).

En la última exploración clínica, la mayoría de los animales presentaron disnea en menor o mayor medida. Sin embargo, el cordero 109 del grupo 3 fue el único cordero en presentar fiebre, taquipnea y una fuerte disnea. Por ello, se decidió tratarle con antibiótico (Florvex: florfenicol 300mg/ml) durante 5 días (27/02/22 al 03/03/22).

Tabla 2. Resultados de las exploraciones clínicas de los corderos de los diferentes grupos y muestreos

		1			2			3		
		91	93	113	85	95	112	109	111	117
T1	Temperatura (°C)	38,1	38,7	38	39,2	38,7	38,6	38,9	38,4	38,3
	Frec. Card. (lpm)	156	168	198	186	114	180	198	174	192
	Frec. Resp. (rpm)	36	36	36	42	36	36	42	36	36
	Ectima	No	No	No	No	No	No	No	No	No
	Diarrea	No	Sí	No	No	No	No	Sí	No	No
T2	Disnea	No	No	No	No	No	No	Ligera	No	No
	Temperatura (°C)	38,9	39,8	39,2	38,9	38,4	38,4	38,8	38,4	39,1
	Frec. Card. (lpm)	148	144	128	>200	124	124	176	140	175
	Frec. Resp. (rpm)	36	36	44	44	36	40	44	36	36
	Ectima	Vesícula	Vesículas/pápulas	Vesícula	Vesícula	No	No	Vesículas/pápulas	Vesícula	Vesícula
T3	Diarrea	No	No	No	No	No	No	Sí	No	No
	Disnea	Ligera	No	No	No	No	No	Fuerte	Ligera	No
	Temperatura (°C)	38,9	38,7	38,3	39,1	38,5	39,2	39,1	38,8	38,8
	Frec. Card. (lpm)	160	160	148	176	148	148	172	164	172
	Frec. Resp. (rpm)	36	36	48	36	36	36	69	44	36
T4	Ectima	Vesículas/pápulas	Vesículas/pápulas	Vesículas/pápulas	Vesícula	No	No	Vesículas/pápulas	Vesículas/pápulas	Vesículas/pápulas
	Diarrea	No	No	No	No	No	No	No	Sí	Sí
	Disnea	No	Ligera	Mixta	No	Ligera	No	Fuerte	Ligera	No
	Temperatura (°C)	39,2	39,1	39,2	39,3	39,4	39,2	40,4	39,7	39,2
	Frec. Card. (lpm)	132	128	128	144	152	148	148	168	168
TF	Frec. Resp. (rpm)	36	36	36	36	36	36	48	40	36
	Ectima	Costras	Costras	Costras	Costra	No	No	Costras	Costras	Costras
	Diarrea	No	No	No	No	No	No	No	No	No
	Disnea	No	No	Mixta	Ligera	Ligera	No	Fuerte	Ligera	Ligera

4.2 Pruebas laboratoriales

4.2.1 Análisis hematológico

Para todos los parámetros se obtuvieron valores dentro de los rangos de normalidad.

4.2.2 Detección de anticuerpos frente al virus orf

Se realizaron 5 muestreos durante los 21 días que duró el experimento y en ninguno de ellos se detectaron anticuerpos específicos contra el virus orf. Todas las serologías salieron negativas.

4.2.3 Determinación de la carga viral mediante qPCR

Para los resultados, haremos referencia siempre a los corderos inoculados por vía intradérmica, vía subcutánea y mediante escarificación como grupos 1, 2 y 3 respectivamente.

La técnica de qPCR confirmó la presencia del virus en los animales inoculados, tal como se muestra en la Tabla 3 y en la Figura 9.

Tabla 3. Resultados de PCR en los diferentes grupos y muestreos, expresados como valor Cq

	Cq								
	Intradérmica			Subcutánea			Escarificación		
	91	93	113	85	95	112	109	111	117
T1	28,72	27,77	37,49	27,85	27,78	28,58	28,73	32,68	No Cq
T2	24,5	29,71	23,38	26,64	27,46	27,95	21,52	23,46	35,43
T3	24,19	23,97	19,47	22,41	23,47	No Cq	20,46	14,64	16,99
T4	19,15	21,73	22,81	28,13	No Cq	25,44	19,27	19,83	15,76
TF	39,28	No Cq	No Cq	34,39	31,89	37,13	39,17	No Cq	26,34

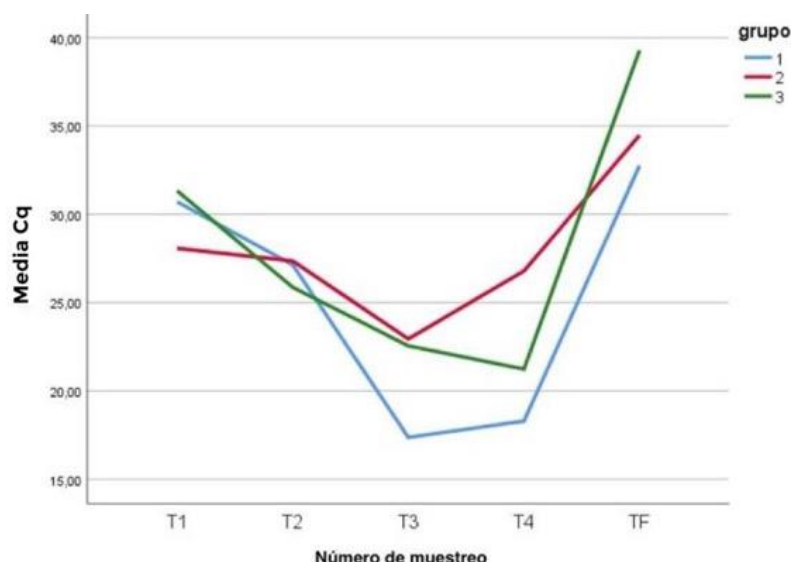


Figura 9. Evolución de la media del valor Cq en cada grupo a lo largo de los muestreos

En T0, todos los animales son PCR negativos para virus orf por eso no se indica este muestreo en la tabla 4 ni en la figura 9. Los primeros resultados PCR positivos aparecen en T1, un día después de la infección. Para T1, T2, T3 y TF, no se detectan problemas de normalidad y al realizar la comparación entre las medias de los grupos, tampoco se detectan diferencias significativas. Sin embargo, en T4, sí que se detectan diferencias significativas entre los grupos 1 y 2 ($p < 0,050$) (Tabla 4). En el grupo 2, la media del valor Cq es significativamente mayor que en el grupo 1, lo que indica que la media de la carga viral del grupo 1 en esa toma es significativamente mayor que en el grupo 2.

No es hasta TF que encontramos valores Cq superiores a 38. El grupo 3 no aparece en la descriptiva ya que sólo hubo un resultado positivo para un único individuo ($Cq = 39,28$), el resto fueron negativos significando que no se detectó el virus.

Tabla 4. Estudio estadístico de los valores Cq en los distintos grupos y tomas
Letras distintas en una fila indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,005$)

Tiempo	Estadístico	Grupo			P
		1	2	3	
T1	Media \pm DE	30,70 \pm 2,793	28,07 \pm ,443	31,33 \pm 5,359	0,555
	Mínimo	28,73	27,78	27,77	
	Máximo	32,68	28,58	37,49	
T2	Media \pm DE	27,14 \pm 7,331	27,35 \pm ,662	25,86 \pm 3,378	0,916
	Mínimo	21,52	26,64	23,38	
	Máximo	35,43	27,95	29,71	

T3	Media \pm DE	17,36 \pm 2,928	22,94 \pm ,749	22,54 \pm 2,664	0,085
	Mínimo	14,64	22,41	19,47	
	Máximo	20,46	23,47	24,19	
T4	Media \pm DE	18,29 \pm 2,206 _a	26,78 \pm 1,902 _b	21,23 \pm 1,880 _{a,b}	0,016
	Mínimo	15,76	25,44	19,15	
	Máximo	19,83	28,13	22,81	
TF	Media \pm DE	32,75 \pm 9,072	34,47 \pm 2,621		0,762
	Mínimo	26,34	31,89		
	Máximo	39,17	37,13		

Además, se observó una correlación negativa, altamente significativa y de valor medio (entre 0 y 1) entre el número de lesiones de ectima desarrolladas por los animales y el valor Cq de la PCR (valor correlación = -0,490 y p = 0,002). Es decir que a un mayor número de lesiones corresponde una mayor carga viral (menor valor Cq).

4. 3 Necropsias y estudio histopatológico

4. 3.1 Infección intradérmica (Grupo 1)

En las necropsias se observó que todos los corderos presentaban lesiones macroscópicas en los labios y alrededor del hocico (Figura 10).



Figura 10. Lesiones de EC visibles en el momento de la necropsia en los corderos inoculados por vía intradérmica

Además, el cordero 91 tenía lesiones en la lengua y el paladar ulcerado (Figura 11).



Figura 11. Lesiones en paladar y lengua del cordero 91

Durante el estudio histopatológico, se confirmó que los tres animales del grupo presentaban una dermatitis mononuclear severa difusa con predominancia linfocitaria (Figura 12B), una dermatitis intraepidérmica vesicular y pustular multifocal (Figura 12C) y la presencia de úlceras distribuidas multifocalmente asociadas a costras e infiltrado neutrofílico (Figura 12D). Además, se observó una moderada proliferación del estrato espinoso (acantosis) con presencia de vacuolización celular (espongiosis) y cuerpos de inclusión eosinofílicos intracitoplasmáticos.

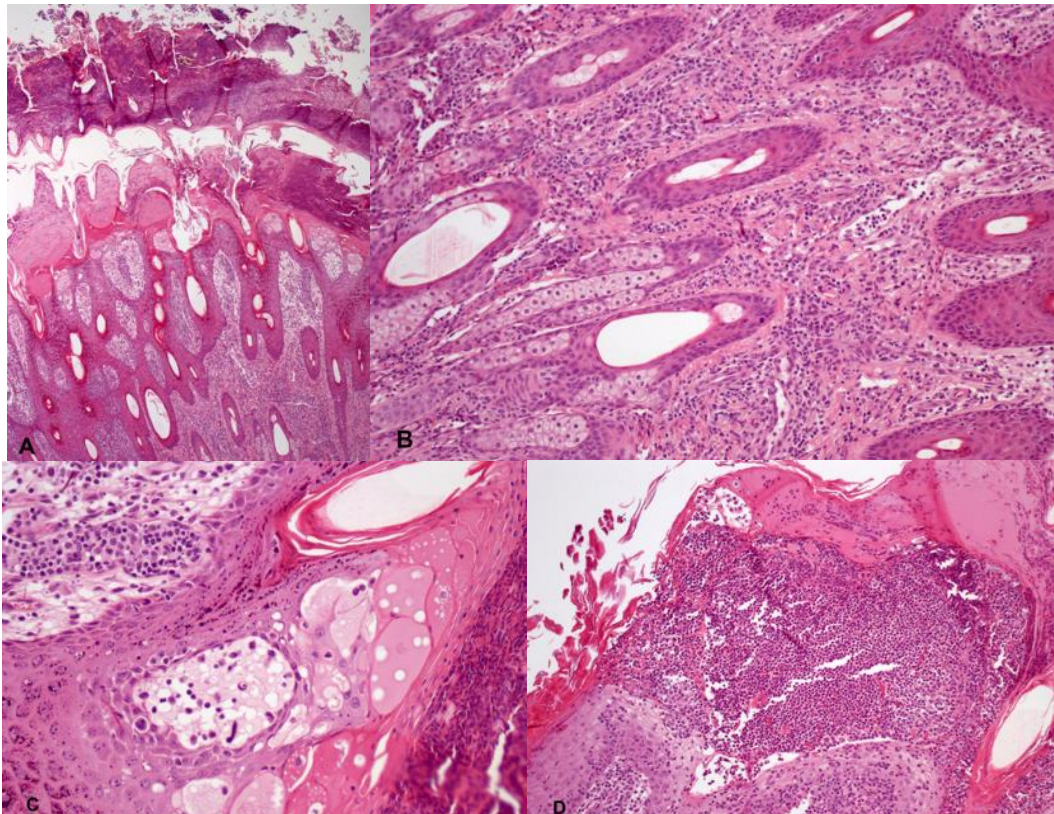


Figura 12. Cortes histológicos de la piel lesionada del cordero 113. (A) Piel (x4); (B) Dermatitis linfocitaria (x10); (C) Dermatitis (epidermis) vesicular (x20) y (D) Úlcera (x10)

Los animales 91 y 113 desarrollaron lesiones en lengua correspondientes a una glositis mononuclear difusa con severa hiperqueratosis paraqueratótica, acantosis, edema del estrato espinoso y presencia de cuerpos de inclusión eosinofílicos intracitoplasmáticos.

Además, el cordero 91 presentó una estomatitis (palatitis) mononuclear difusa con presencia de úlceras asociadas a costras e infiltrado neutrofílico y presencia de colonias bacterianas secundarias intralesionales.

Ninguno presentó lesiones en esófago (leve acantosis) o rumen (leve paraqueratosis).

Los corderos 91 y 93 presentaron lesiones en pulmón siendo estas respectivamente una hiperplasia de BALT (tejido linfóide asociado a bronquios) y una bronconeumonía catarral-supurativa severa multifocal con presencia de células gigantes (macrófagos multinucleados).

Por último, en el animal 113 se observó una queilitis mononuclear difusa con presencia de úlceras multifocales asociadas a costras e infiltrado neutrofílico y una moderada acantosis.

4.3.2 Infección subcutánea (Grupo 2)

El cordero 85 fue el único de este grupo en presentar una lesión macroscópica. Fue una lesión mínima en el labio inferior derecho como se aprecia en la Figura 13.

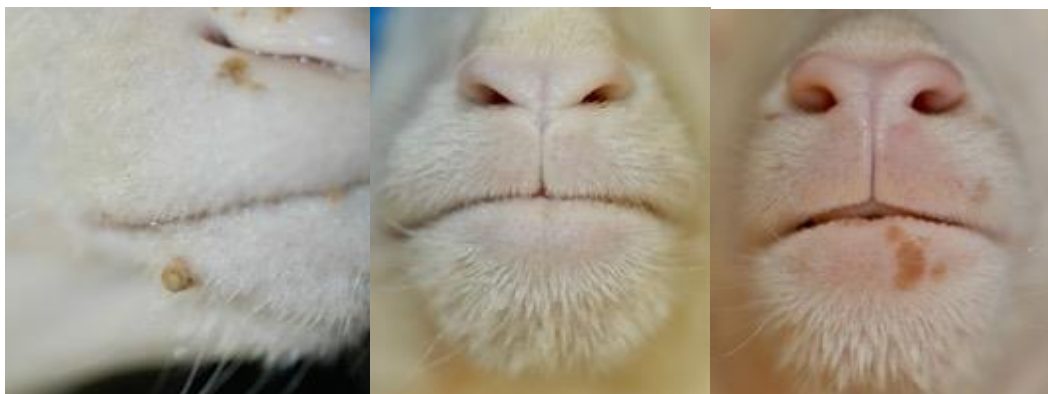


Figura 13. Lesiones de EC visibles en el momento de la necropsia en el cordero 85 del grupo inoculado por vía subcutánea

En las muestras del cordero 85, se observó una dermatitis mononuclear leve difusa, con predominancia de linfocitos y en menor medida neutrófilos y una moderada acantosis; en el labio, una hiperqueratosis paraqueratótica y acantosis con presencia de vacuolización de algunas células del estrato espinoso (espongiosis) y en el paladar, la presencia de un infiltrado inflamatorio linfóide y neutrofílico en la dermis.

Dos de los corderos de este grupo presentaron lesiones en el pulmón, una bronconeumonía catarral-supurativa leve multifocal (cordero 85) y una bronconeumonía intersticial leve multifocal (cordero 95).

Ningún cordero de este grupo presentó lesiones en esófago o rumen.

Aunque en no se vieron lesiones macroscópicas durante la necropsia en los corderos 95 y 112, al realizar el estudio histológico, sí que se encontraron algunos hallazgos. El cordero 95 presentó en la piel de la cara y lengua, una proliferación, edema y vacuolización citoplasmática de las células del estrato espinoso (acantosis) y estrato basal mientras que en el cordero 112 se observó una acantosis, edema del estrato espinoso y basal y vacuolización citoplasmática de las células de dichos estratos y una estomatitis (palatitis) mononuclear multifocal focalizada en la dermis, acantosis y proliferación del estrato basal.

4.3.3 Infección mediante escarificación (Grupo 3)

En el momento de la necropsia se apreciaron lesiones macroscópicas en los labios de los tres corderos de este grupo, que afectaban en especial a la zona de las comisuras de los labios (Figura 14).



Figura 14. Lesiones de EC visibles en el momento de la necropsia en los corderos inoculados mediante escarificación

El cordero 111 además presentó una lesión en el ángulo posterior del ojo (Figura 15A) y el 109, unas zonas de posible ulceración en el rumen y lesiones en las extremidades (Figura 15B).



Figura 15. Lesiones en la piel alrededor del ojo del cordero 111 (A) y en las extremidades del cordero 109 (B)

El estudio histológico reveló que los tres animales de este grupo presentaban una dermatitis mononuclear severa difusa con predominancia linfocitaria, una dermatitis intraepidérmica vesicular y pustular multifocal y presencia de úlceras distribuidas multifocalmente asociadas a costras e infiltrado neutrofílico. Además, se observó una moderada proliferación del estrato espinoso (acantosis) con presencia de vacuolización celular (espongiosis) y cuerpos de inclusión eosinofílicos intracitoplasmáticos y una hiperplasia epitelial de las glándulas de la dermis.

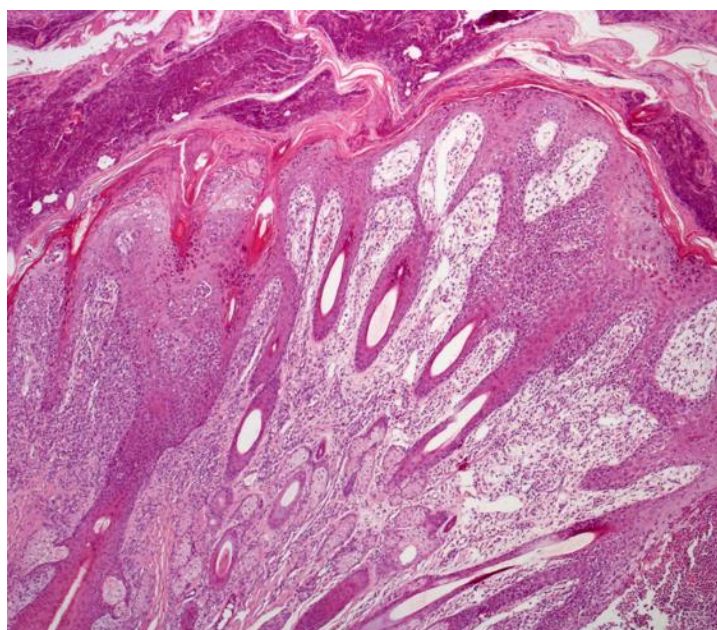


Figura 16. Corte histológico de la piel lesionada de la cara del cordero 113

No se observaron lesiones en paladar, esófago, lengua (acantosis y proliferación del estrato basal) o rumen (paraqueratosis), pero todos presentaron lesiones en el pulmón. Una bronconeumonía catarral-supurativa hemorrágica severa multifocal con atelectasia (cordero 109), una bronconeumonía catarral-supurativa severa multifocal con presencia de células gigantes (posiblemente macrófagos multinucleados) y atelectasia (cordero 111) y una leve neumonía intersticial (cordero 117).

El animal 109 fue el único en presentar lesiones en la piel de las extremidades que corresponden a una dermatitis mononuclear leve difusa con predominancia linfocitaria y una hiperqueratosis ortoqueratótica con presencia de perlas de queratina y cuerpos de inclusión.

4.4 Lesiones desarrolladas tras la infección. Estudio estadístico

Para realizar las estadísticas se consideran varios registros siendo T0 la fecha de la infección experimental, T1 a T4 los muestreos y exploraciones programadas y TF la fecha de las necropsias.

Tabla 5. Registros de los muestreos, exploraciones programadas y necropsias.

N. registro	Fecha	Días desde la infección
T0	24-FEB-22	0
T1	25-FEB-22	1
T2	01-MAR-22	5
T3	08-MAR-22	12
T4	14-MAR-22	18
TF	16-MAR-22 Grupo 1 y 2	20
	Grupo 3	21

4.4.1 Tipos de lesiones

Se trata de una variable cualitativa con cuatro categorías: Ninguna lesión, solo vesículas/pústulas, ambas lesiones (vesículas/pústulas y costras) y solo costras.

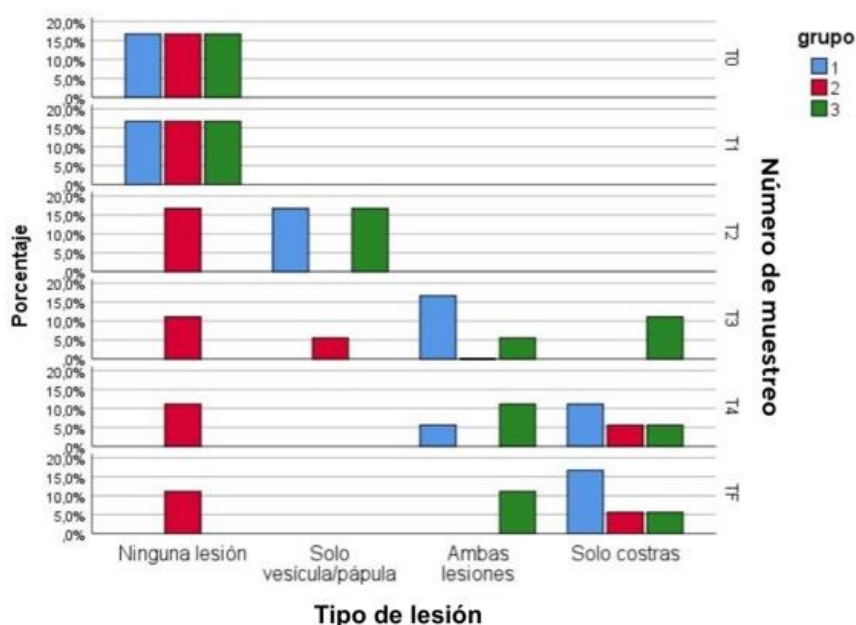


Figura 17. Tipos de lesiones que presentan los corderos de cada grupo a lo largo del periodo de estudio

Para cada grupo, tenemos 3 individuos y 6 lecturas en los diferentes tiempos, lo que da un total de 18 datos totales en cada grupo. Los porcentajes en cada número de registro están calculados sobre este total. Por eso en T0, el % que corresponde al grupo 1 y ninguna lesión es: $3/18 = 0.1666$ (16.66%, como aparece en el eje vertical de a izquierda). Y lo mismo pasa en T0 para los demás grupos.

En la Figura 17 se desglosa la distribución del tipo de lesiones observadas en los corderos de cada grupo a lo largo del periodo de estudio. Como puede apreciarse en la Tabla 4 donde se resumen los resultados del estudio estadístico, no se aprecian diferencias entre los grupos en T0 y T1 ya que no hay ningún tipo de lesiones en ninguno de los grupos en estos muestreos.

Sin embargo, a los 5 días P.I, en T2, aparecen ya vesículas o pápulas en todos los animales de los grupos 1 y 3, mientras que todos los individuos del grupo 2 carecen todavía de lesiones.

En T3, aparecen ya costras en los grupos 1 y 3. La distribución de lesiones globales es diferente entre grupos, aunque solo se detectan diferencias significativas entre grupos en cuanto al valor de la variable “ambas lesiones” ya que ninguno de los individuos del grupo 2 muestra “ambas lesiones” y todos los del grupo 1 las presentan. Los del grupo 3 no presentan diferencias significativas con respecto a ninguno de los otros grupos.

En T4, no se detectan diferencias significativas entre los grupos ya que mientras que el grupo 2 presenta individuos sin lesiones y con solo costras, los grupos 1 y 3 presentan individuos con las dos lesiones y con solo costras.

De igual modo, en TF, los resultados no aparecen muy claros. El grupo 2 presenta individuos sin lesiones y con solo costras, todos los individuos del grupo 1 aparecen con costras y el grupo 3 presenta individuos con las dos lesiones y con solo costras.

Tabla 6. Análisis estadístico del tipo de lesiones en cada grupo y momento de estudio.
Letras distintas en una fila indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$)

Tiempo	Lesión	Grupo			P
		1	2	3	
T0	Ninguna lesión	3	3	3	
		100,0%	100,0%	100,0%	
T1	Ninguna lesión	3	3	3	
		100,0%	100,0%	100,0%	
T2	Ninguna lesión	0 _a	3 _b	0 _a	0,011
		0,0%	100,0%	0,0%	
	Solo vesícula/pápula	3 _a	0 _b	3 _a	
		100,0%	0,0%	100,0%	
T3	Ninguna lesión	0	2	0	0,036
		0,00%	66,70%	0,00%	
	Solo vesícula/pápula	0	1	0	
		0,00%	33,30%	0,00%	
	Ambas lesiones	3 _a	0 _b	1 _{a, b}	
		100,00%	0,00%	33,30%	
T4	Solo costras	0	0	2	0,165
		0,00%	0,00%	66,70%	
	Ninguna lesión	0	2	0	
		0,00%	66,70%	0,00%	
	Ambas lesiones	1	0	2	
		33,30%	0,00%	66,70%	

TF	Solo costras	2	1	1	0,048
		66,70%	33,30%	33,30%	
	Ninguna lesión	0	2	0	
		0,00%	66,70%	0,00%	
	Ambas lesiones	0	0	2	
		0,00%	0,00%	66,70%	
	Solo costras	3	1	1	
		100,00%	33,30%	33,30%	

4.4.2 Número total de lesiones

Es una variable cuantitativa que resulta de sumar todas las lesiones del mismo individuo en cada registro.

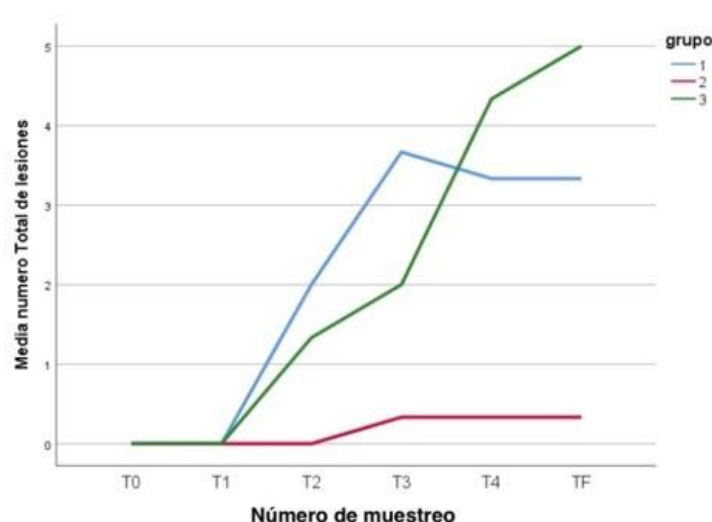


Figura 18. Evolución de la media del número total de lesiones en los distintos grupos de animales a lo largo del periodo de estudio

Los resultados obtenidos se han organizado en la Figura 18 y en la Tabla 7. Tal como puede apreciarse, a partir del muestreo T2, ya se ven lesiones en algunos grupos y hay diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, en T2 y T4, el valor de p está muy próximo al límite para la significación por lo que las comparaciones múltiples dentro de cada fila entre grupos no son capaces de detectar estas diferencias.

En T3 y TF, por el contrario, el valor de p es más bajo por lo que las comparaciones por parejas cuantifican estas diferencias. Para T3, se detectan diferencias significativas entre los grupos 1 y 2, con valores más altos en el grupo 1. Los corderos inoculados intradérmicamente presentan más lesiones que aquellos que fueron inoculados por vía subcutánea.

Por último, para TF, se detectan diferencias significativas entre los grupos 2 y 3, con valores más altos en el 3. Es decir que los corderos inoculados por escarificación presentan más lesiones que los inoculados por vía subcutánea.

Tabla 7. Análisis estadístico del número total de lesiones en cada grupo y momento de estudio.
Letras distintas en una fila indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$)

Tiempo	Estadístico	Grupo			P
		1	2	3	
T2	Media \pm DE	2,00 \pm 1,732	0	1,33	0,046
	Mínimo	1	0	1	
	Máximo	4	0	2	
T3	Media \pm DE	3,67 \pm 1,155 _a	0,33 \pm 0,577 _b	2,00 \pm 1,000 _{a,b}	0,041
	Mínimo	3	0	1	
	Máximo	5	1	3	
T4	Media \pm DE	3,33 \pm 0,577	0,33 \pm 0,577	4,33 \pm 1,528	0,048
	Mínimo	3	0	3	
	Máximo	4	1	6	
TF	Media \pm DE	3,33 \pm 0,577 _{a,b}	0,33 \pm 0,577 _a	5,00 \pm 1,000 _b	0,030
	Mínimo	3	0	4	
	Máximo	4	1	6	

4.4.3 Tiempo hasta la aparición de la primera lesión

Para este estudio es importante tener en cuenta que en el grupo 2, hay dos individuos que no presentan lesión en ningún momento. La última observación se produce 21 días después de la infección, pero ese tiempo puede ser más largo. Sin embargo, consideramos que no van a presentar nunca lesiones y que este es un tiempo incompleto o censurado.

Tabla 8. Resumen del procesamiento de casos siendo los “eventos” los individuos que muestran lesión en algún momento del periodo de estudio y “censurados” aquellos individuos que se mantienen sin lesión en todo el periodo del experimento

Grupo	N total	N de eventos	Censurado	
			N	Porcentaje
1	3	3	0	0,00%
2	3	1	2	66,70%
3	3	3	0	0,00%

Como se aprecia en la Tabla 9, se apreciaron diferencias significativas entre los grupos con respecto al tiempo transcurrido hasta la aparición de la primera lesión

Tabla 9. Medias del tiempo de aparición de la primera lesión en los grupos de estudio
Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$)

Grupo	Media \pm DE	P
1	5,000 \pm 0,000 _a	0,018
2	15,667 \pm 3,538 _b	
3	5,000 \pm 0,000 _a	

En el grupo 2, el tiempo medio transcurrido hasta la aparición de la primera lesión fue significativamente más alto ($p=0,018$) que, en los demás grupos, entre los que no se detecta diferencia significativa. Esto es debido a que los corderos inoculados vía intradérmica y por escarificación presentaron todas las lesiones a los 5 días, mientras en el grupo de corderos inoculados vía subcutánea dos de ellos no llegaron a presentar lesiones y en el otro y aparecieron a los 7 días tras la inoculación.

4.4.4 Gravedad de las lesiones

Es una variable ordinal, por lo que se trata como una variable cualitativa (porcentajes y comparación mediante chi-cuadrado).

En la Tabla 10, se detalla la gravedad de las lesiones encontradas en los órganos de los corderos en el momento de la necropsia, aplicando el valor 0 cuando no se encontraron lesiones y los valores 1, 2 y 3 cuando estas fueron leves, moderadas o graves, respectivamente. En la Tabla 11, se resume el estudio estadístico realizado a estos datos.

Tabla 10. Clasificación de las lesiones en función de la gravedad y órganos afectados

Organos afectados	Gravedad lesiones (Sin lesión = 0, leve = 1, moderado = 2 y grave=3)								
	Infección intradérmica			Infección subcutánea			Infección por escarificación		
	91	93	113	85	95	112	111	117	109
Piel	3	3	3	1	0	0	3	3	3
Lengua	3	0	3	0	0	0	0	0	0
Paladar	2	1	1	1	0	0	0	0	0
Labio	2	2	2	1	0	0	3	3	3
Esófago	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rumen	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piel extremidades	0	0	0	0	0	0	0	0	1

En el estudio de la gravedad de las lesiones en la piel, observamos que, si bien el valor de chi cuadrado no llega a ser significativo, podemos hablar de tendencia (ya que p es menor que 0,10). La comparación entre grupos muestra diferencias significativas en cuanto a lesiones graves ya que el grupo 2 carece de ellas, mientras que suponen el 100% de las lesiones de piel en los grupos 1 y 3. El pequeño número de animales considerado, con un recuento esperado menor que 5 en todas las casillas, puede explicar estos problemas.

En el caso de las lesiones en paladar, el valor de chi-cuadrado tampoco llega a ser significativo y aquí no puede hablarse de tendencia, pero la comparación entre grupos muestra diferencias significativas en cuanto a la ausencia de lesión. El grupo 3 carece de esta categoría, mientras que supone el 100% en el grupo 1. El grupo 2 no muestra diferencias con ninguno de los otros. Volvemos a tener el problema de que el número de animales considerado es pequeño, con un recuento esperado menor que 5 en todas las casillas.

El estudio de las lesiones del labio es el único en el que se detectan diferencias altamente significativas entre los grupos. Estas diferencias afectan a las categorías moderada y severa. El

grupo 3 presenta un 100% de valores moderados frente al resto de grupos que muestran 0 % en esta categoría. El grupo 1 presenta un 100% en la categoría severa, mientras que el resto de los grupos presentan 0% en esta categoría. Por último, en el estudio de las lesiones en lengua y piel de las extremidades, no se detectan diferencias significativas en cuanto a la distribución de la gravedad entre los grupos y no aparecen lesiones en esófago o rumen en ningún caso.

Tabla 11. Análisis estadístico de la gravedad de las lesiones en los órganos afectados para cada grupo de corderos
Letras distintas en una fila indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$)

Localización	Gravedad lesiones	Grupo			P
		1	2	3	
Piel	Sin lesión	0	2	0	0,061
		0,00%	66,70%	0,00%	
	Moderada	0	1	0	
		0,00%	33,30%	0,00%	
	Grave	3 _a	0 _b	3 _a	
		100,00%	0,00%	100,00%	
Lengua	Sin lesión	3	3	1	0,076
		100,00%	100,00%	33,30%	
	Severa	0	0	2	
		0,00%	0,00%	66,70%	
Paladar	Sin lesión	3 _a	2 _{a, b}	0 _b	0,147
		100,00%	66,70%	0,00%	
	Leve	0	1	2	
		0,00%	33,30%	66,70%	
	Moderada	0	0	1	
		0,00%	0,00%	33,30%	
Labio	Sin lesión	0	2	0	0,006
		0,00%	66,70%	0,00%	
	Leve	0	1	0	
		0,00%	33,30%	0,00%	
	Moderada	0 _a	0 _a	3 _b	
		0,00%	0,00%	100,00%	
	Severa	3 _a	0 _b	0 _b	
		100,00%	0,00%	0,00%	
Esófago	Sin lesión	3	3	3	
		100,00%	100,00%	100,00%	
Rumen	Sin lesión	3	3	3	
		100,00%	100,00%	100,00%	

Piel Extremidades	Sin lesión	2	3	3	0,325
		66,70%	100,00%	100,00%	
	Leve	1	0	0	
		33,30%	0,00%	0,00%	

5. DISCUSIÓN

5.1 Desarrollo de lesiones de EC y estudio estadístico

Los resultados obtenidos en el experimento confirmaron que las lesiones de EC aparecen a los 5 días post-inoculación, tal y como era lo esperable. Sin embargo, estas no remitieron tan rápido y tardaron más de los 4-5 días teóricos en desaparecer. Aunque el virus orf inoculado pudo ser detectado por PCR en todos los corderos desde el momento T1, estos no desarrollaron anticuerpos en los 20 días que duró el experimento. Este resultado puede considerarse en principio normal, ya que la presencia de anticuerpos neutralizantes frente a orf es demostrable entre los 15 y 30 días post-infección (Poulain et al. 1972) y este experimento no ha completado este tiempo. Sería interesante realizar más estudios profundizando en este aspecto, analizando la presencia de anticuerpos durante más tiempo tras la inoculación experimental, para llegar a determinar si se produce la respuesta inmune humoral.

Dentro del grupo de corderos inoculados por vía subcutánea (Grupo 2), el cordero 85 fue el único que desarrolló lesiones, y además de forma muy leve. En concreto, se apreció una única lesión que no llegó a extenderse. Esto podría ser debido a que, a la hora de inocularle el virus, la aguja no se quedó en el tejido subcutáneo, la capa de piel directamente debajo de la dermis y la epidermis, por lo que no se depositó el inóculo en el lugar adecuado. Teniendo en cuenta nuestro objetivo de obtener un grado de desarrollo de lesiones similar en todos los animales que formen parte del estudio, podemos descartar la vía subcutánea ya que es la única de las vías testadas en la que no todos los individuos presentan lesiones macroscópicas de EC.

Por otro lado, en los corderos inoculados por escarificación, el crecimiento era más proliferativo mientras que en los que fueron inoculados por vía intradérmica, las lesiones estaban más localizadas en los puntos de inoculación y afectaban a todos los tejidos bucales. Esta última por lo tanto es la más parecida a la enfermedad natural.

Sin embargo, estos resultados son preliminares, el experimento se llevó a cabo con 9 corderos. Este reducido número de individuos limita y condiciona el estudio estadístico y sus resultados. Por ejemplo, en la prueba de Chi-cuadrado, obtuvimos valores de p muy próximos al límite para la significación (0,05) y en algunos casos, el obtener valores no significativos no implica que realmente que no haya diferencias, sino que, debido al pequeño número de la muestra, esta prueba no es capaz de detectarlas. Por este motivo sería conveniente ampliar el estudio a un mayor número de animales para obtener resultados estadísticos más robustos

5.2 Estudio histopatológico

Para tomar una decisión acerca de que vía de inoculación para llevar a cabo la infección experimental con el virus orf es la más adecuada para nuestros propósitos, es imprescindible realizar también un estudio histológico. Los métodos de análisis histológico son una herramienta que nos ayuda a confirmar o refutar los hallazgos macroscópicos observados en necropsias y a realizar un diagnóstico completo. En este caso, observamos que no coincide completamente lo observado macroscópicamente con los hallazgos microscópicos. Por ejemplo, mientras que, en las necropsias, los corderos 95 y 112 (inoculados por vía subcutánea) no presentaban lesiones macroscópicas de EC, en el estudio histológico sí que se vio afectada la piel y labio donde se les inóculo el virus orf.

No se vieron signos de infecciones secundarias a pesar de ser comunes en infecciones por EC. En los pulmones con bronconeumonía, observados principalmente en los corderos que han sido inoculados por escarificación, hay células de difícil clasificación, aleatoriamente distribuidas. Se puede tratar de células epiteliales o células gigantes (macrófagos multinucleados). En el caso de que sean células gigantes se podría asociar a pequeñas aspiraciones de material alimenticio, por ejemplo, leche y, en consecuencia, una reacción de cuerpo extraño asociada. Los corderos estaban acostumbrados a tomar leche ad libitum en su explotación de origen y cuando llegaron a la Facultad, pasaron a tomar biberones 3 veces al día por lo que estos mostraban un comportamiento ansioso que pudo ocasionar estas supuestas degluciones desviadas.

La gravedad lesional es muy similar entre la vía intradérmica (Figura 12 A) y la de escarificación (Figura 16). Ambas provocan una dermatitis severa con lesiones muy notables macroscópicamente. Podemos ordenar las vías de infección de forma decreciente en función de la gravedad de las lesiones histológicas de la siguiente manera: Infección por escarificación > infección intradérmica > infección subcutánea.

Como diferencia entre las vías de escarificación e intradérmica, podemos concluir que las lesiones por vía intradérmica son más globales. En la inoculación intradérmica, las lesiones histológicas asociadas al virus del EC se observan en todos los tejidos bucales, es decir, produce una estomatitis afectando a piel, labio, lengua y paladar. Sin embargo, cuando la inoculación es por escarificación, las lesiones relevantes solo se producen en la piel, probablemente en la zona de inoculación del virus. La vía intradérmica resulta por lo tanto la vía de infección experimental más parecida a la infección natural del virus orf.

Teniendo esto en cuenta y, sabiendo que mediante la vía de escarificación resulta imposible asegurar la completa y correcta asunción de la misma cantidad de virus por todos los animales inoculados, partiendo de la misma dosis, se puede deducir que la vía intradérmica sería la vía de elección para realizar la infección de los animales de la segunda parte del estudio. Mediante la inoculación intradérmica se puede reproducir la enfermedad de forma homogénea en todos los animales provocando lesiones típicas de EC localizadas y que afectan a todos los tejidos bucales, con una gravedad similar a la desarrollada por la enfermedad natural y con la ventaja de poder asegurar que todos los animales reciben la misma dosis de inóculo.

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este estudio se deducen las siguientes conclusiones

1. Tras la infección experimental con virus orf en corderos, solo se obtuvo un desarrollo de lesiones macroscópicas de ectima contagioso en todos los corderos inoculados cuando se utilizaron la vía intradérmica y mediante escarificación.
2. La inyección subcutánea del virus orf provocó la infección de todos los corderos inoculados, pero no el desarrollo de lesiones macroscópicas de EC en la zona de inoculación.
3. En todos los corderos que desarrollaron lesiones de EC, estas aparecieron a los 5 días post-inoculación.
4. Los corderos inoculados mediante escarificación desarrollaron lesiones más extensas, pero que solo afectaron a la zona de piel donde se realizó la inoculación. En los inoculados por la vía intradérmica las lesiones fueron más localizadas pero afectaron a todos los tejidos bucales, de forma parecida a como ocurre en la infección natural.
5. A nivel histológico, la gravedad de las lesiones desarrolladas fue similar en la vía intradérmica y en la inoculación mediante escarificación.
6. Como conclusión final, la vía intradérmica fue la vía elegida para realizar la infección experimental con virus orf en corderos ya que reprodujo la enfermedad de forma homogénea en todos los animales, provocando lesiones típicas de EC localizadas y que afectaron a todos los tejidos bucales y con una gravedad similar a la desarrollada por la enfermedad natural, presentando la ventaja adicional de que todos los animales pueden asumir la misma dosis de inóculo.

CONCLUSIONS

From the results obtained in this study, the following conclusions can be deduced:

1. After the experimental infection with orf virus of the lambs, there was only a development of macroscopic lesions of contagious ecthyma (CE) in all lambs when intradermal or scarification routes were used.
2. Subcutaneous injection of orf virus caused infection of all inoculated lambs, but not the appearance of macroscopic CE lesions.
3. All lambs that developed CE lesions, showed them at 5 days post-inoculation.

4. Lambs inoculated by scarification developed more extensive lesions, which only affected the skin area where the inoculation was performed. However, in those inoculated by the intradermal route, the lesions were more located and affected all the oral tissues, as occurs in the natural infection.
5. From a histological point of view, the severity of the lesions originated was similar in the intradermal route and in the inoculation by scarification.
6. As a final conclusion, the intradermal route was the chosen route to perform the experimental infection with orf virus in lambs since it reproduced the disease in a homogeneous way in all animals causing typical located lesions of CE, affecting all oral tissues with a severity similar to that developed by the natural disease and presenting the additional advantage that all animals can assume the same dose of inoculum.

7. VALORACIÓN PERSONAL

La realización de este trabajo me ha permitido comprender la dificultad de planear y realizar una infección experimental y valorar la importancia de ser rigurosa en los trabajos de investigación. Además, me ha permitido profundizar en mis conocimientos sobre estadística y representación de datos.

Me gustaría agradecer a mi tutora, Aurora y a todo el equipo del SCRUM especialmente a Delia, Marta, Héctor, Paula, Marina y Helena que me ayudaron en todo el proceso y sobretodo a cuidar, dar biberones, sangrar, explorar y muestrear durante 20 días a 9 corderos muy cabezotas.

Gracias a Teresa Tejedor por su predisposición y ayuda en la parte estadística y a Lluís, Alex, Estela y Ana por ayudarme con las necropsias y el estudio histológico.

Con este trabajo me despido de 5 años que me han hecho crecer como profesional y como persona. Estaré siempre agradecida a mi familia por su apoyo incondicional.

8. BIBLIOGRAFÍA

Acha, P. and Szyfres, B. (2003) *Zoonosis y Enfermedades Transmisibles comunes al Hombre y a los animales*, 2, pp. 71-73.

Adedeji, A. J., Adole, J. A., Chima, N. C., Maguda, A. S., Dyek, D. Y., Jambo, A. R., Anefu, E. O., Shallmizhili, I. J. and Luka, P.D. (2018) 'Contagious ecthyma in three flocks of goats in Jos-south IGA, Plateau State, Nigeria', *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 16, pp. 107-112. doi: 10.4314/sokjvs.v16i1.16

Alcami, A. and Smith, G.L. (1997) 'Soluble interferon- γ receptors encoded by poxviruses', *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 19, pp. 305-319. doi: 10.1016/0147-9571(96)00013-6

Bala, J. A., Balakrishnan, K. N., Abdullah, A. A., Mohamed, R. B., Haron, A. W., Jesse, F. F. A., Noordin, M. M. and Mohd-Azmi, M. L. (2018) 'The re-emerging of orf virus infection: a call for surveillance, vaccination and effective control measures', *Journal of Microbial Pathogenesis*, 120, pp. 55-63. doi: 10.1016/j.micpath.2018.04.057

Culling, C. (1974) *Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques*. 3a ed. Butterworth-Heinemann. doi: 10.1016/C2013-0-04011-X

Delhon, G., Tulman, E.R., Afonso, C. L., Lu, Z., de la Concha-Bermejillo, A., Lehmkuhl, H. D., Piccone, M. E., Kutish, G. F. and Rock, D. L. (2004) 'Genomes of the parapoxviruses ORF virus and bovine papular stomatitis virus', *Journal of Virology*, 78, pp. 168-177. doi: 10.1128/jvi.78.1.168-177.2004

Fleming, S. B., Blok, J., Fracer, K. M., Mercer, A. A. and Robinson, A. J. (1993) 'Conservation of gene structure and arrangement between vaccinia virus and orf virus', *Virology*, 195, pp. 175-184. doi: 10.1006/viro.1993.1358

Fleming, S. B., McCaughan, C. A., Andrews, A. E., Nash, A. D. and Mercer A. A. (1997) 'A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus', *Journal of Virology*, 71, pp. 4857-4861. doi: 10.1128/JVI.71.6.4857-4861.1997

Fleming, S. B., Wise, L. N. and Mercer, A. A. (2015) 'Molecular genetic analysis of orf virus: a poxvirus that has adapted to skin', *Viruses*, 7, pp. 1505-1539. doi: 10.3390/v7031505

Haig, D. M. and Mercer, A. A. (1998) 'Ovine diseases. Orf.', *Veterinary Research*, 29, pp. 311-326.

Hosamani, M., Bhanuprakash, V., Scagliarini, A. and Singh, R. K. (2006) 'Comparative sequence analysis of major envelope protein gene (B2L) of Indian orf viruses isolated from sheep and goats', *Veterinary Microbiology*, 116 (4), pp. 317-324. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.04.028

Kaaden, O., Czerny, C. and Eichhorn, W. (1997) *Viral Zoonoses and Food of Animal Origin: A Re-Evaluation of Possible Hazards for Human Health*, Springer Wien New York, p.25.

Kottaridi, C., Nomikou, K., Lelli, R., Markoulatos, P. and Mangana, O. (2006) 'Laboratory diagnosis of contagious ecthyma: comparison of different PCR protocols with virus isolation in cell culture', *Journal of Virological Methods*, 134, pp. 119-124. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.12.005

- Lawan, Z., Bala, J. A., Bukar, A. M., Balakrishnan, K. N., Mangga, H. K., Abdullah, F. F. J., Noordin, M. M. and Mohd-Azmi, M. L. (2021) "Contagious ecthyma: how serious is the disease worldwide?", *Animal Health Research Reviews*. Cambridge University Press, 22 (1), pp. 40–55. doi: 10.1017/S1466252320000018
- Li, W., Ning, Z., Hao, W., Song, D., Gao, F., Zhao, K., Liao, X., Li, M., Rock, D. L., Shuhong, L. (2012) 'Isolation and phylogenetic analysis of orf virus from the sheep herd outbreak in northeast China', *BMC Veterinary Research*, 8. doi: 10.1186/1746-6148-8-229
- Lyttle, D. J., Fraser, K. M., Fleming, S. B., Mercer, A. A. and Robinson A. (1994) 'Homology of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus', *Journal of Virology*, 68, pp. 84-92. doi: 10.1128/JVI.68.1.84-92.1994
- Maganga, G. D., Relmy, A., Bakkali-Kassimi, L., Ngoubangoye, B., Tsoumbou, T., Bouchier, C., N'Dilimabaka, N., Leroy, E. M., Zientara, S. and Berthet, N. (2016) 'Molecular characterization of orf virus in goats in Gabon, Central Africa', *Virology Journal*, 13, 79. doi: 10.1186/s12985-016-0535-1
- Mandell, G., Bennett, J. and Dolin, R. (2002) *Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica. Volumen 2*, Editorial Medica Panamericana, pp.1898-1903
- Matthews, R. E. F. (1984) *Clasificación y nomenclatura de los virus: cuarto informe del comité internacional de taxonomía de virus*, Grupo de Virología de la Sociedad Española de Microbiología.
- Mauldin, E. A. and Peters-Kennedy, J. (2016) 'Integumentary System', *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 1*, pp.616-618. doi: 10.1016/B978-0-7020-5317-7.00006-0
- Mercer, A. A. and Haig, D. M. (1999) 'Parapoxviruses', *The Encyclopedia of Virology*, Academic Press, New York. pp. 1140-1146.
- Mercer, A. A., Wise, L. M., Scagliarini, A., McInnes, C. J., Buttner, M., Rziha, H. J., McCaughan C. A., Fleming, S. B., Ueda, N. and Nettleton, P. F. (2002) 'Vascular endothelial growth factors encoded by Orf virus show surprising sequence variation but have a conserved, functionally relevant structure', *Journal of General Virology*, 83, pp. 2845-2855. doi: 10.1099/0022-1317-83-11-2845
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, MAPA (2021) *Sector ovino y caprino en España*. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/ovino-caprino/default.aspx> [Consultado: 28/03/22]
- Nandi, S., Rao, T. V. S. and Malik, P. (1999) 'Sheep pox—a scourge to sheep industry in India', *Indian Farming*, 49, pp. 29-31.
- Nandi, S., De, U.K. and Chowdhury, S. (2011) 'Current status of contagious ecthyma or orf disease in goat and sheep—A global perspective', *Small ruminant research*, 96 (2-3), pp. 73-82. doi: 10.1016/j.smallrumres.2010.11.018
- Ovejero, J. I. (2007) 'Ectima contagioso ovino', *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias*, 15, pp. 73-86.

Petrie, A. and Watson, P. (2013). *Statistics for veterinary and animal science*, Oxford: Blackwell Science.

Poulain, J., Gourreau, J. M., Dautigny, A. and Rapine, P. (1972) 'Ecthyma contagieux du mouton: anticorps sériques neutralisants', *Annales de Recherches Vétérinaires*, 3 (4), pp. 571-579.

Ramos, J. J. and Ferrer, L. M. (2007) *La exploración clínica del ganado ovino y su entorno*, Editorial Servet.

Rao, B. T., Das, H. J., Sharma, R. D. and Singh, S.S. (1994) 'Some observations on an outbreak of sheep pox in sheep in East Godavari District, Andhra Pradesh', *Livest Adviser*, 19, pp. 3-6.

Requena, L. and Requena, C. (2010) 'Histopathology of the more common viral skin infections', *Actas Dermo-Sifiliográficas* (English Edition), 101(3), pp.201-216.
doi: 10.1016/S1578-2190(10)70618-1

Singari, N. A., Moorthy, A. S. and Rama Rao, P. (1990) 'Sheep pox', *Livest Adviser*, 15, pp. 40-42

Tryland, M., Klein, J., Berger, T., Josefsen, T. D., das Neves, C. G., Oksanen, A. and Åsbakk, K. (2013) 'Experimental parapoxvirus infection (contagious ecthyma) in semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*)', *Veterinary Microbiology*, 162 (2-4), pp. 499-506. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.10.039

Van Vloten, J. P., Minott, J. A., McAusland, T. M., Ingrao, J. C., Santry, L. A., McFadden, G., Petrik, J. J., Bridle, B. W. and Wootton, S. K. (2021). 'Production and purification of high-titer OrfV for preclinical studies in vaccinology and cancer therapy', *Molecular therapy. Methods & clinical development*, 23, pp. 434-447. doi: 10.1016/j.omtm.2021.08.004

Vikøren, T., Lillehaug, A., Åkerstedt, J., Bretten, T., Haugum, M., Tryland, M. (2008) 'A severe outbreak of contagious ecthyma (orf) in a free-ranging musk ox (*Ovibos moschatus*) population in Norway', *Veterinary Microbiology*, 127 (1-2), pp. 10-20.
doi: 10.1016/j.vetmic.2007.07.029

Wang, R. and Luo, S. (2018) 'Orf Virus: A New Class of Immunotherapy Drugs', D. Vlachakis (ed.), *Systems Biology*, IntechOpen, London. doi: 10.5772/intechopen.81535.

Wilson, D. J., Scott, P. R., Sargison, N. D., Bell, G. and Rhind, S. M. (2002) 'Effective treatment of severe facial dermatitis in lambs', *Veterinary Record*, 150, pp. 45-46.
doi: 10.1136/vr.150.2.45

Zarnke, R. L., Dieterich, R. A., Neiland, K. A. and Ranglack, G. (1983) 'Serological and experimental investigations of contagious ecthyma in Alaska', *Journal of Wildlife Diseases*, 19, pp. 170-173.
doi: 10.7589/0090-3558-19.3.170

Zhang, K., Xiao, Y., Yu, M., Liu, J., Wang, Q., Tao, P., Liu, S. and Ning, Z. (2016) 'Phylogenetic analysis of three orf virus strains isolated from different districts in Shandong Province, East China', *Journal of Veterinary Medical Science*, 77, pp. 1639-1645. doi: 10.1292/jvms.15-0368