



**Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria



## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	2
1. SUMMARY .....	2
2. INTRODUCCIÓN .....	3
2.1. ETIOLOGÍA .....	4
2.2. TRANSMISIÓN .....	5
2.3. PATOGENIA Y RESPUESTA INMUNE .....	5
2.4. CUADRO CLÍNICO Y LESIONAL .....	7
2.5. PREVENCIÓN, CONTROL Y MANEJO TERAPÉUTICO ACTUAL .....	7
2.6. TRATAMIENTO CON TRI-SOLFEN® .....	9
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	11
3.1. OBJETIVO GENERAL .....	11
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
4. METODOLOGÍA .....	12
4.1. ANIMALES .....	12
4.2. INFECCIÓN EXPERIMENTAL .....	13
4.3. APLICACIÓN DEL TRATAMIENTO .....	14
4.4. PROGRESIÓN CLÍNICA .....	14
4.5. MUESTREO Y ANÁLISIS LABORATORIAL .....	15
4.6. SACRIFICIO Y ESTUDIO POST-MORTEM .....	16
4.7. ESTUDIO ESTADÍSTICO .....	17
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	18
5.1. PESOS .....	18
5.2. PROGRESIÓN CLÍNICA .....	20
5.3. HEMATOLOGÍAS .....	24
5.4. <i>REAL-TIME PCR</i> .....	27
5.5. SEROLOGÍAS .....	29
6. CONCLUSIONES .....	32
6. CONCLUSIONS .....	32
7. VALORACIÓN PERSONAL .....	33
8. BIBLIOGRAFÍA .....	34

## 1. RESUMEN

El ectima contagioso es una infección eruptiva de la piel muy contagiosa de las ovejas y las cabras, que afecta principalmente a animales jóvenes en su primer año de vida, aunque también tiene impacto en otros animales domésticos y silvestres. Está causada por el virus *orf* del género *Parapoxvirus* y posee carácter zoonótico. El Tri-Solfen® (TS®, Animal Ethics Pty Ltd, Australia) es un producto tópico que se desarrolló para su uso en procedimientos quirúrgicos en ganado ovino y bovino en Australia, y se ha empleado en el tratamiento de la fiebre aftosa en Laos y Camerún. Su composición consta de dos anestésicos locales (lidocaína y bupivacaína), adrenalina y un antiséptico (cetrimida), proporcionando alivio del dolor y una curación más rápida de las lesiones. El objetivo del presente trabajo era comprobar la efectividad de este tratamiento anestésico/analgésico frente al ectima contagioso. Se dispuso de cincuenta corderos infectados experimentalmente con el virus *orf* y repartidos en dos grupos homogéneos de veinticinco (uno tratado con Tri-Solfen® y otro sin tratar, como grupo control). Todos fueron evaluados y monitorizados según su peso, progresión clínica (fotografías de las lesiones), hematología, Real-Time PCR y serología. El tratamiento con Tri-Solfen® no tuvo efecto en la ganancia de peso de los corderos, no se pudo demostrar un retraso en la aparición o una menor gravedad de la progresión clínica de las lesiones, así como no fue posible determinar que poseyera un efecto viricida frente al virus *orf*. Los parámetros hematológicos mostraron monocitosis inicial como respuesta a las lesiones en ambos grupos y un recuento de eosinófilos significativamente más alto en el lote tratado. Se determinó, finalmente, que la seroconversión tras la infección experimental se produce a los 35 días post-infección.

## 1. SUMMARY

Contagious ecthyma is a highly contagious eruptive skin infection of sheep and goats, which mainly affects young animals in their first year of life, although it also has an impact on other domestic and wild animals. It is caused by the *orf* virus of the genus *Parapoxvirus* and has a zoonotic character. Tri-Solfen® (TS®, Animal Ethics Pty Ltd, Australia) is a topical product developed for surgical procedures in sheep and cattle in Australia, and has been used in the treatment of foot-and-mouth disease in Laos and Cameroon. Its composition consists of two local anaesthetics (lidocaine and bupivacaine), adrenaline and an antiseptic (cetrimide), providing pain relief and faster healing of wounds. The objective of this study was to verify the effectiveness of this anaesthetic/analgesic treatment against contagious ecthyma. Fifty lambs experimentally infected with the *orf* virus were divided into two homogeneous groups of twenty-five (one treated with Tri-Solfen® and one untreated, as a control group). All were

evaluated and monitored according to their weight, clinical progression (photographs of the lesions), haematology, Real-Time PCR and serology. Treatment with Tri-Solfen® had no effect on the weight gain of the lambs, a delay in onset or a lower severity of the clinical progression of the lesions could not be demonstrated, as well as it was not possible to determine that it had a viricidal effect on the *orf* virus. Haematological parameters showed initial monocytosis in response to lesions in both groups and a significantly higher eosinophil count in the treated batch. It was finally determined that seroconversion after experimental infection occurs 35 days after infection.

## 2. INTRODUCCIÓN

En España, según los datos estadísticos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2021), el sector ovino y caprino representa el 11% de la Producción Final Ganadera y el censo ovino es el primero en importancia dentro de la Unión Europea con un total de 15 millones de cabezas. Por otra parte, se sabe que el ectima contagioso (EC), enfermedad que nos ocupa en el presente trabajo, se incluye en la lista de enfermedades con mayor incidencia económica en los rebaños ovinos, tanto dentro como fuera de nuestro país (Alcaide y Rodríguez, 2016). Así mismo, en un estudio realizado en Inglaterra (Lovatt, 2013), se observó que el padecimiento de esta enfermedad repercutía en la ganancia de peso de los corderos enfermos. También lo hacía en los costes de producción y el margen de beneficio, incrementándose los gastos asociados a la alimentación, al uso de medicamentos y servicios veterinarios. Considerando todo esto, se puede afirmar que la enfermedad en estudio posee una gran importancia a nivel económico para las explotaciones de ganado ovino, no sólo en España sino en la producción ovina internacional.

El ectima contagioso es una infección eruptiva de la piel muy contagiosa de las ovejas y las cabras, causada por el virus *orf* del género *Parapoxvirus*. Afecta principalmente a animales jóvenes en su primer año de vida, si bien puede afectar a otros animales domésticos y silvestres. Aunque menos frecuentemente que en corderos, también se pueden observar lesiones de ectima en las glándulas mamarias de las ovejas durante la lactación, así como afectando a labios, boca y, menos habitualmente, extremidades de animales adultos. Se transmite por contacto directo o por medio de fómites, y se piensa que entra a la piel a través de cortes o abrasiones. El periodo de incubación es corto: unos 2 o 3 días tras la exposición en las infecciones naturales y unos 5 días en las experimentales (CFSPP, 2015). Sin complicaciones secundarias, el EC es una enfermedad autolimitante, con lesiones que se recuperan en torno a seis semanas desde el inicio del curso clínico, permaneciendo los animales inmunes a la reinfección durante algunos

años (Matthews, 2013). El diagnóstico suele hacerse de forma sintomática, pero puede confirmarse con PCR (CFSPH, 2015). Con gran probabilidad, la presentación oral del EC está infradiagnosticado en los brotes de campo, además de que las lesiones orales inaparentes podrían representar un medio no conocido de introducción del virus en rebaños que anteriormente no se encontraban infectados (McElroy y Basset, 2007).

Los brotes más graves están asociados habitualmente al manejo ovino intensivo, causando graves pérdidas económicas. Además, es una enfermedad zoonósica, que se da mayoritariamente en personas implicadas de manera directa o indirecta en el contacto con animales infectados (como veterinarios o ganaderos).

El EC normalmente no resulta fatal, pero es una enfermedad debilitante que puede llegar a ser mortal en los corderos y cabritos que no pueden mamar o sufren infecciones bacterianas o fúngicas secundarias (Haig y McInnes, 2002). La morbilidad de la enfermedad alcanza cerca del 100% y la mortalidad debida a infecciones bacterianas secundarias podría llegar a ser del 15% en un brote grave de enfermedad (Gumbrell y McGregor, 1997).

A pesar de que la erradicación es difícil una vez el virus ha entrado a un rebaño, la vacunación con vacuna viva es la mejor opción para controlar la enfermedad, siendo capaz de bloquear la evolución del cuadro clínico e inducir una rápida recuperación (Spyrou y Valiakos, 2015). Sin embargo, actualmente, en España y otros muchos países, la vacuna comercial no está disponible.

El tratamiento habitual llevado a cabo en las explotaciones se basa en prácticas higiénicas y el manejo de las infecciones secundarias con antibióticos (Spyrou y Valiakos, 2015). Con la emergente preocupación sobre la resistencia generalizada a los antibióticos, se requieren tratamientos alternativos para controlar la infección y evitar su uso indiscriminado.

## 2.1. ETIOLOGÍA

El agente responsable del ectima contagioso es, como se ha mencionado anteriormente, el virus *orf* perteneciente al género *Parapoxvirus* y a la familia *Poxviridae*.

Lo que el virus *orf* tiene en común con otros parapoxvirus, es que este se replica en el citoplasma de las células hospedadoras y codifica su propia maquinaria para la transcripción y replicación del ADN. La región central posee genes esenciales para la replicación y producción de partículas víricas, mientras que los genes terminales de virulencia no esenciales se encuentran relacionados con la patogénesis viral (Moss, 1996; Mercer y Haig, 1999). Dichos genes

terminales codifican factores de virulencia y proteínas que interactúan con componentes del sistema inmune del hospedador (Nandi, De y Chowdhury, 2011).

Los parapoxvirus se distinguen de otros poxvirus por su forma ovoide, un patrón entrecruzado en la superficie, su pequeño tamaño y el alto contenido de guanina y cisteína (sobre el 64%) en su genoma (Mercer y Haig, 1999; Delhon et al., 2004).

## 2.2. TRANSMISIÓN

El EC está distribuido a nivel mundial. En una revisión sobre la perspectiva global de esta enfermedad en ovejas y cabras de Nandi, De y Chowdhury (2011), se recoge que el virus *orf* es resistente en ambientes secos y es capaz de sobrevivir durante meses e incluso años, pero su persistencia puede ser más corta en condiciones de frío y humedad; asimismo, permanece viable en la lana de animales recuperados por periodos considerables y accede al organismo por vía de la piel rota, escarificada o dañada de otra manera y se replica en las células epidérmicas.

Nandi, De y Chowdhury (2011, pp. 2-3) afirman que la enfermedad es habitualmente transmitida a través del contacto de animales infectados con animales susceptibles. Sin embargo, la transmisión del virus *orf* también puede darse durante intervenciones de cirugía mayor o menor, el contacto manual, la administración de medicamentos vía oral y el crotalado de los animales. Y como conclusión, enuncian que la forma más efectiva de evitar la entrada del virus *orf* a una nueva zona es evitando la entrada de animales infectados por medio de la restricción de movimientos tanto de los propios animales como de sus productos y, así pues, previniendo la difusión de la enfermedad.

## 2.3. PATOGENIA Y RESPUESTA INMUNE

En referencia a la patogenia de la enfermedad, en el ectima contagioso la piel es el principal y esencial lugar para el establecimiento y desarrollo de las lesiones. Al inicio, el virus se replica en las capas celulares epidérmicas de las paredes del folículo de lana (Nandi, De y Chowdhury, 2011). A través de abrasiones, el virus penetra en la piel de la mucosa y conduce a la formación de acantosis, degeneración globular de las células espinosas, hiperplasia de las células basales e inflamación edematosas y granulomatosa de las células dérmicas. El virus produce las lesiones características del EC en una secuencia de pápulas, vesículas, pústulas y costras, que conducirán a su posterior resolución. A pesar de que la patogénesis es simple, se complica debido a las infecciones bacterianas secundarias, frecuentemente por la invasión de estafilococos, estreptococos alfa hemolíticos y corinebacterias. En el caso de las ovejas adultas, el virus *orf* infecta los pezones de las hembras en lactación y las lleva a padecer mastitis con o sin invasión de *Staphylococcus* sp. (Nandi, De y Chowdhury, 2011).

El virus *orf* contiene numerosos factores de virulencia, los más importantes son: el gen del factor de crecimiento endotelial de virulencia de los mamíferos (VEGF) (Lyttle et al., 1994), el gen ovino homólogo del virus *orf* que codifica la citoquina IL-10 (Fleming et al., 1997), el gen de la resistencia al interferón del virus *orf* (OVIFNR) y el gen que inhibe el factor estimulante de la citoquina inflamatoria de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Nandi, De y Chowdhury, 2011). Entre todos ellos, existen proteínas con una función antiinflamatoria: con ellas se ve inducida la proliferación celular de la epidermis y los endotelios, aumenta la permeabilidad vascular y la angiogénesis de la piel, teniendo disponibles células epidérmicas de división reciente, de forma que se estimula el crecimiento y replicación virales. Como se ha mencionado antes, se trata de una infección autolimitante y se resuelve en un intervalo de unas 6 a 8 semanas, aunque también se puede dar la reinfección del huésped, en ese caso, las lesiones posteriores son más pequeñas y se pueden curar en 3 semanas (Bergqvist, Kurban y Abbas, 2017). Posteriormente, los animales recuperados suelen mantener inmunidad frente a la infección durante 2 o 3 años (Smith, 2015).

La calidad e intensidad de la infección por el virus *orf* depende de las dinámicas de las células de respuesta inmune, los anticuerpos y la actividad de las citoquinas (Nandi, De y Chowdhury, 2011). Los estudios inmunológicos en la piel de las ovejas primoinfectadas y reinfectadas han demostrado que hay una acumulación de neutrófilos, células T, células B, células dendríticas subyacentes y adyacentes a las células epidérmicas infectadas por el virus *orf*. La acumulación y la disminución del número de estas células es paralela a la presencia del virus (medido como antígeno viral) en células epidérmicas infectadas (Haig y McInnes, 2002). Las células T CD4 son las células T predominantes en la piel, tanto en las lesiones primarias como en las de reinfección; no obstante, en las infecciones primarias, las células T CD8 y las células B se acumulan lentamente en comparación con las células T CD4, y las células T gd son más numerosas que en lesiones de reinfección (Haig y McInnes, 2002).

Sólo hay protección parcial según la enfermedad clínica o la vacunación. Las ovejas infectadas por el virus *orf* producen anticuerpos contra cinco antígenos inmunodominantes. Los anticuerpos monoclonales reconocen las proteínas 39kDa y 42kDa de la envoltura, la proteína de fusión putativa de 10kDa y las proteínas no caracterizadas de 22kDa y 65kDa (Nandi, De y Chowdhury, 2011). Estos antígenos son extremadamente útiles para la diferenciación de los diferentes parapoxvirus (Housawi et al., 1998).

## 2.4. CUADRO CLÍNICO Y LESIONAL

La infección de la cavidad bucal de los ovinos debida al virus *orf* da lugar a una estomatitis pápulo-erosiva (Darbyshire, 1961; Lance et al., 1981; Robinson y Balassu, 1981; Eisa et al., 1985; Hawkins et al., 1991; McElroy y Basset, 2007). Hay también otras causas infecciosas de estomatitis en ovejas asociadas a lesiones erosivas, como el virus de la Fiebre Aftosa (Watson, 2002; McElroy y Basset, 2007), el de la Lengua Azul (Erasmus, 1975; McElroy y Basset, 2007), el de la Peste de los Pequeños Rumiantes (Lefevre y Diallo, 1990; McElroy y Basset, 2007) o la Viruela Ovina (Bhanuprakash et al., 2006), y todas ellas pueden comprometer el comercio del ganado, añadiéndose esto a las causas por las cuales el ectima contagioso tiene tanta importancia económica. Las lesiones se desarrollan concretamente en las encías adjuntas a los incisivos y también en la lengua y sobre el paladar duro y para su desarrollo se requiere una pérdida previa de integridad de la superficie epitelial (Robinson y Balassu, 1981; McElroy y Basset, 2007). La infección de la piel y la mucosa oral causan un eritema que progresó rápidamente a la aparición de pústulas y deriva en lesiones hipertróficas e hiperplásicas, finalmente con la formación de costras (Windsor et al., 2017).

Los hallazgos histopatológicos incluyen degeneración globular de los queratinocitos e inclusiones citoplasmáticas eosinofílicas. En ocasiones, también se han observado lesiones en el esófago, el rumen, el prepucio y, de forma menos frecuente, en los pulmones, el corazón y el tracto intestinal inferior (CFSPH, 2015).

Las lesiones faciales y orales graves pueden interferir en el amamantamiento, las de las mamas pueden resultar en el abandono de las crías y las lesiones de las extremidades son capaces de derivar en una cojera transitoria del animal (Nandi, De y Chowdhury, 2011). Esto conlleva una pérdida de peso que resulta de un consumo de alimento reducido por las lesiones dolorosas alrededor de la boca, los pezones o las pezuñas (Matthews, 2013).

## 2.5. PREVENCIÓN, CONTROL Y MANEJO TERAPÉUTICO ACTUAL

La prevención de las infecciones por el virus *orf* se basan en medidas zoosanitarias y prácticas de desinfección. En esta línea, los animales enfermos deberían ser mantenidos en cuarentena, separados, alimentados al margen y tratados tras el contacto con el resto del rebaño. A su vez, los locales y los materiales infectados requieren una adecuada desinfección e incluso incineración con el objetivo de reducir el riesgo (Nandi, De y Chowdhury, 2011). Para lo cual existen diversos tipos de desinfectantes químicos ganaderos: alcalinos, halogenados derivados del cloro (lejía) o del yodo, amonio cuaternario, fenólicos (poco empleados por su toxicidad y efecto corrosivo) y aldehídos (Fernández, 2019). Además, la prevención también debería

centrarse en evitar daños o abrasiones en el epitelio de los animales, puesto que esta interrupción de la integridad de la piel es esencial para la entrada del virus (Windsor et al., 2017). Aunque esto es lo que debería hacerse de manera preventiva, la realidad es que a nivel práctico resulta inviable debido al sistema de producción y a la imposibilidad de dar un trato individual a cada animal del rebaño, que se considera un conjunto.

A pesar de que la enfermedad tiene carácter autolimitante, el tratamiento sintomático con antisépticos locales es muy útil para prevenir infecciones secundarias (Nandi, De y Chowdhury, 2011). Entre estas opciones se podrían incluir: la aplicación de una solución yodada al 3% sobre las lesiones (Leite-Browning, 2008) o una mezcla de yodo con vaselina (Nandi, De y Chowdhury, 2011), pomadas que contengan  $KMnO_4$  y ácido bórico (Spyrou y Valiakos, 2015) o crema de cidofovir al 1% (peso/volumen) durante cuatro días consecutivos. Y aparte de los componentes sintéticos, se ha intentado usar ciertas terapias tradicionales a base de hierbas como aceite de sésamo o de ricino, el jugo de *Calotropis procera* (el árbol del caucho) o de *Euphorbia spp.* (Nandi, De y Chowdhury, 2011). Este tipo de tratamientos poseen una difícil aplicación a nivel de granja puesto que deben realizarse de manera diaria e individual, lo cual, como se ha explicado antes y con una altísima morbilidad, se vuelve inviable.

De igual modo, los antibióticos suelen emplearse para controlar la contaminación bacteriana secundaria, que ocurre de forma común (Nandi, De y Chowdhury, 2011). Este uso puede llevar a incrementar el riesgo tanto de los residuos de antibióticos en los alimentos como el desarrollo de resistencias antibióticas (Windsor et al., 2017).

La vacunación es la única y más efectiva opción para el control de la infección (Nandi, De y Chowdhury, 2011). La vacuna contra el *orf* no erradica la enfermedad, pero consigue reducir los signos clínicos y las lesiones. La inmunidad se desarrolla en torno a las 4-8 semanas post-vacunación y ofrece protección durante al menos 12 meses (Small et al., 2019). Es por ello que esta práctica sólo sería factible en las madres y no en los corderos, para los que cuando la inmunidad haya progresado lo suficiente, ya se encontrarán en el cebadero, mientras que la enfermedad tiene lugar en la fase de lactación. Aunque existen varios tipos de vacunas contra el ectima contagioso, las vivas atenuadas siempre son las que se consideran más eficaces, y son usadas en algunas zonas del mundo, donde la enfermedad es endémica. Sin embargo, el uso de virus vivo no está recomendado en granjas que no han sufrido brotes de enfermedad puesto que este podría contaminar el ambiente (Nandi, De y Chowdhury, 2011). En explotaciones libres de EC, las ovejas no deberían vacunarse tras las últimas siete semanas de gestación, ya que las costras que se forman contienen cepas vivas atenuadas del virus *orf* que podrían contaminar los

alojamientos, infectar a los corderos recién nacidos cuando todavía no son inmunocompetentes y dar lugar a una reducción de la ganancia de peso diaria además de a infecciones secundarias. Sin embargo, aquellas granjas en las que el objetivo sea la transmisión de inmunidad a los corderos frente a Ectima Contagioso, la vacunación de las madres debería darse en las cuatro o cinco semanas anteriores al parto. Por su parte, los corderos pueden ser vacunados en cualquier momento después del nacimiento, pero está recomendado hacerlo entre los uno y tres días de edad (Small et al., 2019). Por esta razón, y teniendo en cuenta, como se ha indicado, que el desarrollo de la inmunidad ocurre de un mes a dos meses post-vacunación, cuando los corderos ya se encuentran en cebadero, esta aplicación en los primeros días de vida sería factible en países donde la incidencia de la enfermedad se produce en corderos de cebo, como es el caso de Australia, y no en España, donde se da con mayor frecuencia en el periodo de lactancia.

## 2.6. TRATAMIENTO CON TRI-SOLFEN®

En el presente trabajo experimental se va a poner a prueba un producto anestésico-antiséptico tópico llamado Tri-Solfen® (TS®) frente al EC. El Tri-Solfen® (Tri-Solfen®, Medical Ethics Pty Ltd, Australia) es un producto tópico de aplicación en espray que se desarrolló y registró para su uso en procedimientos quirúrgicos en ganado ovino y bovino en Australia y Nueva Zelanda, y que ha sido empleado para el tratamiento de la fiebre aftosa en Laos y Camerún (Windsor et al., 2020; Lendzele et al., 2021). Actualmente, ya ha sido registrado para su uso en Portugal en el ganado porcino (Trisolfen®), vacuno (Multisolfen®) y equino (Equisolfen®). Proporciona alivio del dolor y una curación más rápida de las lesiones (Windsor et al., 2016; Roberts y Windsor, 2019). El producto contiene dos anestésicos locales (lidocaína y bupivacaína), adrenalina y un antiséptico (cetrimida) en forma de gel que crea un efecto barrera, adormeciendo el dolor de las lesiones, reduciendo rápidamente su infectividad, y acelerando la curación, frenando así la pérdida de peso de los individuos afectados. Con un pH de 2,7, el producto es potencialmente viricida y como provoca antisepsis local, permite evitar la necesidad de otros tratamientos, incluidos los antibióticos.

El inicio del empleo de este producto frente a enfermedades infecciosas causantes de estomatitis, en concreto la fiebre aftosa, se llevó a cabo en un experimento de campo en Camerún (Lendzele et al., 2021). En este país y en gran parte de África, esta patología es endémica y provoca brotes habituales en sus millones de cabezas de ganado. Sin embargo, el acceso a planes vacunales frente a la enfermedad está dificultado en gran parte del territorio africano, haciendo esto que los ganaderos se centren en la búsqueda de opciones de tratamiento para los animales afectados, utilizando antibióticos y/o terapias tradicionales que requieren tiempos prolongados para que los animales lleguen a recuperarse. Por estas razones,

había una necesidad urgente de encontrar alternativas. La prueba de tratamiento clínico se realizó en lesiones de fiebre aftosa recientes, que contenían vesículas intactas o recientemente rotas y se roció en una única aplicación sobre ellas 2ml del producto, según las instrucciones de administración. Este tratamiento se comparó, al mismo tiempo, con el comúnmente usado (la terapia antibiótica) y un grupo de individuos sin tratar como grupo control. El experimento (Lendzele et al., 2021) concluyó, tras el análisis de las observaciones en la respuesta clínica, que el tratamiento con Tri-Solfen® favorecía el retorno del apetito, disminuía rápidamente el tamaño de las lesiones, frenaba la salivación (como indicador de lesiones y dolor orales) y no mostraba diferencias significativas en cuanto a los costes con respecto a otras opciones terapéuticas; en definitiva, aportó la evaluación cuantitativa que confirmaba que el Tri-Solfen® posee eficacia para acelerar la recuperación, abordar inmediatamente el dolor y estimular una curación más rápida de las lesiones de fiebre aftosa, como también se observó en otros estudios llevados a cabo en Laos (Windsor et al., 2020).

En España, se realizó un estudio para determinar la eficacia de este producto frente al virus *orf* (Lacasta et al., 2021), con el objetivo de examinar la posible acción antiviral y las propiedades curativas de la formulación analgésica en el ectima contagioso. En este estudio preliminar, se pudo concluir que el tratamiento con Tri-Solfen®, en etapas tempranas de dicha enfermedad, permitía reducir de forma significativa la carga viral en corderos infectados de forma natural (Lacasta et al., 2021). Esto se explicaría por la absorción del TS® en la capa superficial del epitelio de las lesiones, lo cual provoca que las partículas víricas sean liberadas desde células epiteliales dañadas, suponiendo un efecto negativo para ellas.

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El ectima contagioso es una enfermedad ampliamente extendida en los rebaños ovinos a nivel mundial y de esta patología derivan una serie de pérdidas económicas que se han concretado previamente. Además, teniendo en cuenta que no se dispone de vacuna en nuestro país, ni de un tratamiento efectivo que permita reducir o frenar las lesiones, así como las infecciones secundarias y sus posteriores consecuencias para el animal, se requiere ampliar los estudios sobre el virus *orf*, su patogenia y las posibilidades terapéuticas a poner a disposición de veterinarios y ganaderos y que sean capaces de controlar de un modo directo e inmediato la patología.

En el estudio llevado a cabo en el presente trabajo de fin de grado, se parte de los esperanzadores resultados que ofrece el uso del Tri-Solfen® para tratar animales con fiebre aftosa, en los que, por observaciones clínicas, se ha visto que existe una mejora del bienestar y la curación de las lesiones como resultado del tratamiento con el mencionado producto (Windsor et al., 2020). Además, se amplía el tamaño de la muestra de experimentos anteriores realizados por nuestro equipo de trabajo (Lacasta et al., 2021).

#### 3.1. OBJETIVO GENERAL

Comprobar la viabilidad y eficacia del anestésico tópico Tri-Solfen® como tratamiento en los casos de ectima contagioso en corderos, usando una terapia que proporcione una serie de ventajas frente al actual enfoque y ampliando los resultados de estudios previos a un número de individuos más representativo e infectado de manera experimental.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comprobar la presencia del virus *orf* mediante técnicas moleculares (PCR) en lesiones de animales infectados experimentalmente antes y después del tratamiento con Tri-Solfen®.
- Determinar si el tratamiento con Tri-Solfen® acelera la curación de las lesiones de los animales afectados por el virus *orf*, tomando fotografías diarias para su posterior análisis estadístico.
- Valorar si el tratamiento con Tri-Solfen® y su posible acción sobre las lesiones de ectima tiene un posterior efecto en la ganancia de peso de los animales.
- Determinar el momento de la aparición de respuesta serológica frente al virus *orf* en corderos infectados experimentalmente.

## 4. METODOLOGÍA

En el presente estudio, se llevó a cabo la infección experimental con el virus *orf* en 50 corderos recién nacidos procedentes de una granja comercial de ovino que no había presentado casos clínicos de ectima contagioso durante los últimos tres años. Una vez que los primeros signos de lesión aparecieron, la mitad de los corderos (25) se trataron con TS® y los 25 restantes se mantuvieron como el grupo control. En ambos lotes, se analizaron la evolución de las lesiones y la presencia y viabilidad del virus en ellas durante un mes. Posteriormente, se sacrificaron todos los corderos excepto cinco de cada grupo, que se mantuvieron con vida un mes más con el objetivo de valorar en ellos la respuesta serológica, tras lo que también fueron eutanasiados.

Los anteriores procedimientos fueron supervisados y aprobados por la Comisión Ética asesora para la Experimentación Animal (nº PI33/21), el Comité de Bioseguridad y la Unidad de Prevención de Riesgos Laborales de la Universidad de Zaragoza, de acuerdo a la normativa vigente referente a estos aspectos (R.D. 53/2013, Ley 31/1995, R.D. 664/1997, R.D. 1299/2006).

### 4.1. ANIMALES

La explotación de origen de los corderos debía cumplir una serie de requisitos que permitieran desarrollar el experimento de forma favorable:

- Una granja de ovejas de aptitud lechera con lactación artificial para los corderos, que sería la forma de alimentación que mantendrían durante el estudio.
- Corderos recién nacidos que se encontraran sanos y con una ingesta apropiada de calostro.
- Granja que durante los últimos tres años no hubiera declarado ningún brote de ectima contagioso en ella, con ausencia de signos clínicos durante este tiempo.

Así pues, se reclutaron un total de cincuenta corderos recién nacidos tras la primera toma de calostro (aproximadamente 4 días de edad de media), todos machos, de raza Lacaune y con un peso medio de 5,854 kilogramos, desde una explotación con las características anteriormente descritas localizada en Fonz (Huesca). Estos animales debían ser negativos a la infección por *orf* para lo cual se recogieron muestras de todos ellos y se comprobó: PCR negativa al virus *orf* y la ausencia de respuesta serológica con un test ELISA. Entonces, se trasladaron a las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, donde fueron registrados con crotales individuales para su fácil identificación y fueron distribuidos aleatoriamente en dos boxes independientes y completamente aislados entre ellos, con 25 corderos en cada uno (Lote 1 y Lote 2) durante la completa duración del estudio. De igual manera, se llevó a cabo la medición de los pesos de todos los corderos el día de su recepción, siendo esta la característica tenida en cuenta para la

redistribución de los lotes, tratando de homogeneizar al máximo los grupos antes de aplicar el tratamiento. Posteriormente, el pesaje se realizó de forma semanal hasta su sacrificio.

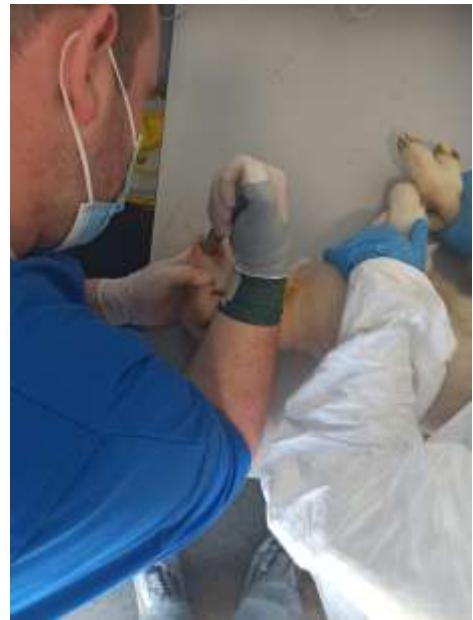
#### 4.2. INFECCIÓN EXPERIMENTAL

El virus empleado para la infección experimental de los corderos del presente estudio se obtuvo en cultivo celular. Se aislaron diferentes estirpes del virus *orf*, mediante el cultivo *in vitro*, procedentes de casos naturales de la enfermedad. Estas se cultivaron en células KOP (kidney bovine) durante 4 días, tras los que se recogió el sobrenadante, se centrifugó y filtró con el fin de realizar un primer paso de purificación. Tras la titulación mediante dilución límite en células KOP, fue distribuido en alícuotas a razón de  $10^4$  pfu/ml. La presencia de virus en estos sobrenadantes fue confirmada mediante PCR.

Tras un trabajo previo llevado a cabo para determinar cuál era la mejor vía de infección del virus, se comprobó que la vía intradérmica ofrecía los mejores resultados (datos sin publicar). De modo que la infección experimental con el virus *orf* se llevó a cabo mediante su administración con pistola de inoculación intradérmica (Imagen 1), que inyecta 0,1ml por disparo. Este dispositivo forma un chorro muy fino y a presión, que perfora la piel y produce una pápula característica y, según la distancia a la que se realice y la inclinación de la pistola respecto al plano cutáneo, la penetración puede variar de la dermis superficial a la profunda. Se usaron un total de  $10^4$  unidades formadoras de placa (pfu) por aplicación (0,1ml). Para esta labor, los animales fueron contenidos manualmente con el objetivo de asegurar su inmovilidad durante la inoculación, de manera que una persona sujetaba las extremidades y el cuerpo del cordero y el responsable de disparar con la pistola de inoculación era el mismo que, con la mano opuesta, inmovilizaba la cabeza (Imagen 2). Asimismo, se registraron los disparos realizados a cada animal, repartidos entre los labios superiores derecho, izquierdo y central; los labios inferiores derecho, izquierdo y central; y el interior de la boca (encías y/o paladar) superior e inferior. En total se administraron una media de 17 disparos por cada cordero (1,7ml/animal).



*Imagen 1. Pistola de inoculación intradérmica empleada y las pápulas características que deja tras el disparo.*



*Imagen 2. Método de contención manual durante la infección experimental.*

#### 4.3. APPLICACIÓN DEL TRATAMIENTO

Tras la infección confirmada mediante PCR del virus y la aparición de las primeras lesiones a los 8 días de la infección experimental, el desarrollo y gravedad de las mismas fue monitorizado diariamente. Tan pronto como las vesículas propias de ectima contagioso fueron detectadas, los animales del Lote 2 fueron tratados con Tri-Solfen®, pulverizando 1,5ml de TS® mediante pistola dosificadora y repartiendo el producto para que todas las lesiones en los labios y el interior de la boca quedaran cubiertas por el mismo. Dicho tratamiento se repitió tres días más tarde (11 días post-inoculación) de igual modo, en las áreas afectadas de la cara. Los 25 corderos del Lote 1 se mantuvieron como grupo control y no se les aplicó tratamiento alguno.

#### 4.4. PROGRESIÓN CLÍNICA

Para el control y análisis de la progresión clínica de las lesiones se tomaron fotografías de todas ellas antes del tratamiento y cada día después del mismo para registrar su evolución en ambos grupos, tanto el grupo control (Lote 1) como el tratado (Lote 2). En cada cordero se fotografiaban ambos perfiles, la parte frontal de la boca y, abriendo los labios, la zona de las encías y los dientes.

Posteriormente, las fotografías fueron agrupadas por cordero en base a la numeración de los crotales, de forma que hubiera un seguimiento de cada cordero durante todo el experimento. Para su posterior estudio estadístico, las imágenes se fueron analizando individualmente y las lesiones fueron codificadas numéricamente en función de las áreas en las que aparecían y del grado de gravedad de las mismas. De este modo se clasificaron en: labio superior derecho (LSD),

labio superior izquierdo (LSI), labio inferior derecho (LID), labio inferior izquierdo (LII), encía y “otras localizaciones”, como la nariz, los ojos, la cara o el prepucio. Así mismo, se procedió a su clasificación según el tipo de lesión (*a* para “pápulas o pústulas”, *b* para “costras” o *c* como “ausencia de lesiones”) y la gravedad de la misma (del 0 al 5, suponiendo el 0 “ausencia de lesiones”, el 1 “lesiones poco graves” y el 5 “lesiones muy graves”). En resumen, de cada cordero se pudo obtener un registro individual diario que mostraba la localización, gravedad y progresión de las lesiones a lo largo de todo el estudio.

#### 4.5. MUESTREO Y ANÁLISIS LABORATORIAL

Durante el tiempo que duró el estudio, se tomaron y analizaron diferentes tipos de muestras para su posterior análisis:

##### 4.5.1. HEMATOLOGÍA

Se tomaron muestras de sangre entera de todos los animales del estudio para su posterior análisis hematológico. Las muestras se recogieron de la vena yugular, mediante tubos para extracción de sangre por sistema de vacíos con anticoagulante EDTA. Se tomaron muestras semanales, una antes de la infección experimental (He0), otra una semana después, cuando comenzaban a aparecer las lesiones, pero aún no se había tratado a los animales (He1) y dos posteriores al tratamiento (He2, 7 días post-tratamiento y He3, 13 días post-tratamiento).

La hematología se llevó a cabo con un contador automático de hematología *IDEXX ProcyteDx* (*IDEXX laboratories*, Westbrook, ME, USA). Midiendo parámetros como los leucocitos (K/ml), eritrocitos (M/ $\mu$ l), hemoglobina (g/dl), hematocrito (%), plaquetas (K/ $\mu$ l), VCM (Volumen Corpuscular Medio; fl), HCM (Hemoglobina Corpuscular Media; pg), CHCM (Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media; g/dl) y reticulocitos (K/ $\mu$ l). Las células sanguíneas de la serie blanca también fueron evaluadas mediante el conteo de neutrófilos (K/ $\mu$ l), linfocitos (K/ $\mu$ l), monocitos (K/ $\mu$ l), basófilos (K/ $\mu$ l) y eosinófilos (K/ $\mu$ l).

##### 4.5.2. REAL TIME – PCR

Con el objetivo de detectar la presencia del virus en la piel y mucosas infectadas, se tomaron muestras mediante hisopos estériles conservados en medio de cultivo (Deltalab). Los hisopos se giraban sobre la piel infectada antes de aparecer las lesiones, y sobre varias de las lesiones observadas en cada cordero, tras aparecer estas. Las muestras se obtuvieron de todos los animales antes de la infección y del tratamiento (H0) y después de la aplicación del Tri-Solfen®: H1 (7 días post-tratamiento), H2 (13 días post-tratamiento), H3 (27 días post-tratamiento).

La muestra H3 fue tomada únicamente a los 10 corderos que continuaron vivos un mes después de la infección, para continuar con su estudio serológico.

La *real-time PCR* se basó en la extracción del ácido nucleico usando el kit comercial *MagMAX™ Pathogen RNA/DNA (Thermo Fisher Scientific)* y el procesador de partículas magnéticas automatizado *KingFisher Flex System (Thermo Fisher Scientific)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de DNA extraído se almacenaron a -80°C hasta el final del muestreo para poder evaluar todas ellas en una única corrida de *real-time PCR*.

La detección del virus *orf* se hizo utilizando el kit comercial de *qPCR EXOone Contagious Ecthyma (Exopol, Spain)* cuyo blanco es el gen BL2 que codifica un antígeno principal de la envoltura vírica. El kit contiene un control positivo sintético cuantificado, y también un control endógeno para evitar resultados falsos-negativos. La amplificación se realizará en un ciclador *FAST 7500 (Applied Biosystems)* siguiendo asimismo las instrucciones del fabricante.

#### 4.5.3. SEROLOGÍA

Las muestras de suero fueron obtenidas del mismo modo que la sangre entera, mediante la extracción de 3ml de sangre por cordero con un sistema de tubos de vacío sin anticoagulante, obteniendo así suero para la detección de anticuerpos frente a EC. Se empleó para ello un test ELISA propio indirecto con un antígeno del virus *orf*, formado por péptidos y proteínas recombinantes de zonas inmunogénicas de su genoma. Las diluciones que fueron utilizadas se componían de esa proteína antigénica (109) y otra serie de péptidos (1, 2, 3), con lo que se distinguían varias combinaciones: 109+1, 109+1+2, 109+1+2+3.

Se tomaron muestras de suero de manera previa a la infección experimental (Se0), para asegurar que los corderos no habían tenido contacto con el virus, y, posteriormente, pre-tratamiento (Se1, 8 días tras la inoculación) y post-tratamiento (Se2 a los 13 días de la aplicación del Tri-Solfen®, Se3 a los 20 días, Se4 a los 27 días y Se5 a los 34 días), con una periodicidad semanal. Las muestras Se4 y Se5 fueron tomadas únicamente a los 10 corderos que permanecieron vivos un mes después de la infección, precisamente para continuar con su estudio serológico.

Los datos se agruparon según el momento de la toma de la muestra (Se0, Se1, Se2, Se3, Se4, Se5) y según la dilución empleada en la prueba ELISA (109+1, 109+1+2, 109+1+2+3). Además, se consideró que los valores resultantes menores que 0,3 eran “negativos” (ausencia de anticuerpos frente a ectima contagioso), los mayores de 0,3 eran “positivos” (presencia de anticuerpos frente a EC) y los que se encontraban alrededor de 0,3 se categorizaron como “dudosos”.

#### 4.6. SACRIFICIO Y ESTUDIO POST-MORTEM

Un mes después de la infección experimental se sometió a sacrificio humanitario a 40 animales de ambos grupos (20 de cada uno), dejando 5 corderos en el grupo control (Lote 1) y 5 corderos

en el grupo tratado (Lote 2) para continuar con su estudio serológico. Estos, fueron igualmente eutanasiados a los 50 días post-infección.

El método de sacrificio fue la inyección intravenosa en vena yugular de EUTHASOL 400mg/ml Solución Inyectable, que contiene como producto activo el pentobarbital sódico. Se administró a una dosis de 140mg/kg, equivalente a 0,35ml/kg, teniendo en cuenta el peso de cada cordero de manera individual.

El estudio *post mortem* consistió en la realización de la necropsia de los corderos, con el registro de los hallazgos macroscópicos mediante fichas y la toma de fotografías. Los resultados de este estudio no se han incluido en el presente trabajo fin de grado.

#### 4.7. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Todos los datos recogidos fueron integrados en una matriz estadística del programa SPSS STATISTICS 26.0.

La comparación de proporciones entre grupos (variables cualitativas) se realizó mediante el test de Chi Cuadrado de Pearson y, alternativamente, mediante la prueba exacta de Fisher (algún esperado <5). La prueba de Shapiro-Wilk se usó para establecer la adecuación de las variables cuantitativas a la distribución normal y cuando las variables no eran normales fueron aplicadas pruebas no paramétricas para las comparaciones entre grupos (prueba no paramétrica U de Mann-Whitney).

En variables de distribución normal, se empleó el análisis de varianza (ANOVA) a una vía para comparar variables cuantitativas entre grupos y se utilizó el análisis de covarianza (ANCOVA) cuando estas comparaciones podían verse afectadas por valores previos de la variable considerada.

El estudio del tiempo hasta la primera lesión fue llevado a cabo mediante técnicas de análisis de supervivencia (Método de Kaplan-Meier) y la comparación de tiempos entre grupos se realizó mediante la prueba de Breslow. Además, la corrección de Bonferroni se aplicó en todos los casos de comparaciones múltiples.

En todos los test estadísticos con los que se determinó la asociación entre variables, valores de  $p<0,05$  se consideraron como significativos.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se expondrán los datos obtenidos en los distintos muestreos llevados a cabo durante la totalidad del experimento, referentes a los pesos de los animales, la progresión clínica de sus lesiones, las hematologías, las pruebas PCR y las serologías de los mismos. Se reflejan mediante tablas de análisis de varianzas y recuentos, así como gráficas, a las que acompaña la discusión de sus resultados. En algunas de las figuras y tablas se muestra únicamente la información concreta que se está argumentando, pero los resultados completos pueden consultarse en los anexos del presente trabajo.

### 5.1. PESOS

En el momento T0, a la llegada de los animales, el peso medio total era de 5,854kg. La comparación entre las medias de los grupos reveló que no existían diferencias significativas entre ellos al principio del experimento, siendo los dos lotes comparables inicialmente en cuanto a peso (Figura 1), lo cual indica que se trataba de lotes homogéneos y, por lo tanto, una manera muy deseable de comenzar el desarrollo del experimento.

T0				
Lote	Media	Desviación Típica	N	p
1	5,958	1,178	24,000	
2	5,758	1,071	26,000	
Total	5,854	1,117	50,000	0,531

Figura 1. Tabla del análisis de varianzas de los pesos medios de los corderos en el momento T0 ( $p=0,531$ ).

En la Figura 2 se muestra la evolución del peso medio de los corderos por lotes durante todo el transcurso de la experiencia. En ella se puede ver que en la primera mitad del estudio (T0, T1, T2, T3 y T4), aproximadamente, la media de los pesos tanto en el Lote 1 (grupo control) como en el Lote 2 (grupo tratado) se mantuvieron muy similares y fueron creciendo progresivamente. Por otra parte, durante la segunda mitad (T4, T5, T6, T7), comenzó a observarse un mayor crecimiento de los corderos del Lote 1 frente a los del Lote 2, tratados con Tri-Solfen®, sin embargo, las diferencias no fueron significativas ( $p>0,05$ ). Gráficamente se aprecia que las barras de error de ambos grupos quedan bastante solapadas y esto significa que, aunque las medias de los dos lotes sean distintas, los valores fuera de la media son bastante semejantes entre ellos, ya correspondan al Lote 1 o al Lote 2, lo cual explica la inexistencia de diferencias significativas.

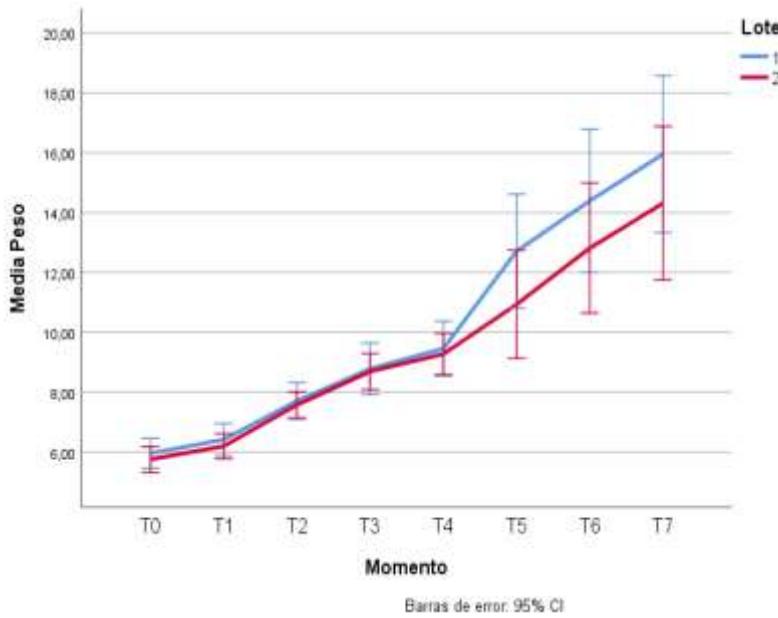


Figura 2. Evolución de los pesos de los corderos del Lote 1 y del Lote 2 a lo largo de todo el estudio.

En un estudio realizado por Lovatt (2013) en varias granjas comerciales de Inglaterra, se analizaron corderos infectados de forma natural por ectima contagioso, sin vacunar y amamantados por sus madres. Se determinó que, a pesar de que entre las dos y cinco semanas de vida no existían diferencias entre los pesos medios de los corderos afectados y los sanos, durante las seis y nueve semanas de edad sí había una diferencia significativa de 2,2kg al comparar entre ambos grupos. Además, en los animales infectados que mostraban lesiones concretamente alrededor de la boca, la diferencia de la media de pesos ascendía a 2,5kg. También, económicamente, la afección por el virus *orf* se traducía en un descenso de 10 libras/kg de peso canal por cada semana que tenía que retrasarse el sacrificio de los corderos afectados, debido a esos bajos índices de crecimiento. De este modo, puede afirmarse que el peso de los corderos afectados por ectima contagioso es uno de los principales factores a tener en cuenta respecto a esta enfermedad, ya que repercute directamente en el beneficio económico que los animales reportan a la explotación. Aunque sí es cierto que la diferencia significativa de peso observada ocurría en un periodo (entre las seis y nueve semanas de edad) en el que los corderos de este experimento ya habrían sido sacrificados.

Por otro lado, en cuanto al empleo del Tri-Solfen® y su repercusión en el aumento de peso de los animales, se hizo una prueba en Australia (Sheil et al., 2021) sobre el impacto del uso de este producto en la curación de heridas durante el termocauterio para el descornado en terneros (n=74). Esta, realizada en condiciones de campo, se componía de dos grupos de individuos en los que el primero recibía un placebo y al otro se le aplicaba Tri-Solfen®. Se advirtió que había tendencia a una mayor ganancia media diaria de peso en los animales que habían recibido el

tratamiento y este parámetro fue mayor en el grupo tratado en todos los tiempos medidos, siendo particularmente notable en los días 11 y 12, donde el efecto calculado de la terapia con Tri-Solfen® fue del 31%. Así pues, se hallaron resultados reveladores en referencia al aumento de peso diario, pero quizá debido a la especie estudiada, al tamaño de muestra o a la disparidad en las características de aquellas heridas con respecto a las propias de EC, no existe similitud entre los resultados de aquella experiencia y este experimento.

En resumen, la estadística de los pesos medios de los corderos del presente estudio, determinó que no existían diferencias significativas de peso entre los lotes ( $p>0,05$ ) en ninguno de los momentos de la experiencia. Por esta razón, no se puede atribuir al “efecto lote” (grupo tratado o grupo control) los cambios en el peso de los animales y, por lo tanto, estos no pueden explicarse por haber recibido el tratamiento con Tri-Solfen® o haber permanecido sin tratar.

## 5.2. PROGRESIÓN CLÍNICA

El seguimiento de la progresión clínica de las lesiones propias de la infección del virus *orf* que fueron apareciendo en los corderos reveló ciertos hallazgos destacables.

Respecto al tiempo medio que tardaron en aparecer las primeras lesiones, como se muestra en la Figura 3, fue en los labios superiores derecho e izquierdo (LSD y LSI) en los que menos tiempo transcurrió hasta empezar a registrar vesículas y pápulas, en una media de 8,8 y 8,6 días post-infección, respectivamente, y teniendo en cuenta que el día 8 tras la inoculación fue cuando se llevó a cabo el tratamiento de los corderos y que hasta entonces se encontraban en igualdad de condiciones. Dicho periodo concuerda con el periodo de incubación de la enfermedad propuesto por otros autores, que variaba de 4 a 8 días según Nandi, De y Chowdhury (2011) y encajando en este intervalo los 5 días de incubación que se dan en las infecciones experimentales (CFSPP, 2015). En cambio, la progresión clínica más tardía se ubicó en las lesiones de las encías (alrededor de los 24 días post-infección). A pesar de que no se encontraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre los grupos en la mayoría de las localizaciones, sí las hubo en el labio inferior derecho (LID) ( $p=0,009$ ) y en las “otras localizaciones” ( $p=0,026$ ), en las cuales fue el Lote 2 donde menor tiempo medio de aparición se registró, ambas en torno a los 11 días post-infección, coincidiendo con la segunda dosis del tratamiento.

	Tiempo de supervivencia (días libres de lesión)					
	Lote	Media	Desv. Típica	N total	N censurado	p
LSD	1	7,52	1,323	25	2	
	2	10,144	1,087	25	3	
	Global	8,829	0,879	50	5	0,083

LSI	Lote	Media	Desv. Típica	N total	N censurado	p
	1	7,2	1,046	25	2	
	2	8,326	1,713	25	2	
	Global	8,638	1,354	50	4	0,920
LID	Lote	Media	Desv. Típica	N total	N censurado	p
	1	14,167	1,113	23	8	
	2	11,287	2,244	27	3	
	Global	15,954	1,955	50	11	0,009
LII	Lote	Media	Desv. Típica	N total	N censurado	p
	1	19,64	3,4 078	25	9	
	2	14,423	3,014	25	6	
	Global	17,155	2,341	50	15	0,496
Encías	Lote	Media	Desv. Típica	N total	N censurado	p
	1	26,52	3,245	25	13	
	2	23,125	3,009	25	10	
	Global	24,857	2,23	50	23	0,850
Otras localizaciones	Lote	Media	Desv. Típica	N total	N censurado	p
	1	13,84	0,913	25	6	
	2	11,284	0,923	25	3	
	Global	12,585	0,675	50	9	0,026

Figura 3. Tabla de análisis de varianzas de las medias para el tiempo de supervivencia. El superíndice <sup>a</sup> implica que la estimación está limitada al tiempo de supervivencia más largo, si está censurado. Se censuran los datos de aquellos corderos que no presentaron lesión en el tiempo que duró el estudio o que murieron.

Durante el periodo de estudio, en ninguna de las localizaciones se encontraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre los grupos acerca de los individuos libres de lesión, existiendo altos porcentajes de individuos con alguna o varias lesiones en ambos lotes (Figura 4). Igualmente, no se observó que ninguno cordero quedara completamente libre de lesiones durante el tiempo analizado, con lo que los 50 animales tuvieron algún tipo de lesión en alguna de las ubicaciones durante algún momento del experimento.

		Lote		Total	p			Lote		Total	p
		1	2			LSD					
Sin ninguna lesión	Recuento	2 <sub>a</sub>	3 <sub>a</sub>	5	1,000	Sin ninguna lesión	Recuento	9 <sub>a</sub>	6 <sub>a</sub>	15	0,54
	% dentro de Lote	8,00%	12,00%	10,00%			% dentro de Lote	36,00%	24,00%	30,00%	
Con alguna lesión	Recuento	23 <sub>a</sub>	22 <sub>a</sub>	45	1,000	Con alguna lesión	Recuento	16 <sub>a</sub>	19 <sub>a</sub>	35	
	% dentro de Lote	92,00%	88,00%	90,00%			% dentro de Lote	64,00%	76,00%	70,00%	
LSI						Encías					

Sin ninguna lesión	Recuento	2 <sub>a</sub>	3 <sub>a</sub>	5	1,000	Sin ninguna lesión	Recuento	13 <sub>a</sub>	10 <sub>a</sub>	23	0,570
	% dentro de Lote	8,00%	12,00%	10,00%			% dentro de Lote	52,00%	40,00%	46,00%	
Con alguna lesión	Recuento	23 <sub>a</sub>	22 <sub>a</sub>	45	0,172	Con alguna lesión	Recuento	12 <sub>a</sub>	15 <sub>a</sub>	27	0,463
	% dentro de Lote	92,00%	88,00%	90,00%			% dentro de Lote	48,00%	60,00%	54,00%	
LID					Otras localizaciones						
Sin ninguna lesión	Recuento	8 <sub>a</sub>	3 <sub>a</sub>	11	0,172	Sin ninguna lesión	Recuento	6 <sub>a</sub>	3 <sub>a</sub>	9	0,463
	% dentro de Lote	32,00%	12,00%	22,00%			% dentro de Lote	24,00%	12,00%	18,00%	
Con alguna lesión	Recuento	17 <sub>a</sub>	22 <sub>a</sub>	39		Con alguna lesión	Recuento	19 <sub>a</sub>	22 <sub>a</sub>	41	
	% dentro de Lote	68,00%	88,00%	78,00%			% dentro de Lote	76,00%	88,00%	82,00%	

Figura 4. Tabla de recuento de los individuos sin ninguna y con alguna lesión en las diferentes localizaciones ( $p>0,05$ ). El subíndice <sub>a</sub> denota que las proporciones de columna no difieren de forma significativa.

Según los resultados respecto al tiempo de aparición y a los individuos libres de lesiones o con ellas presentes, no pudo determinarse que la terapia tópica con Tri-Solfen® supusiera un impedimento o un retraso en su aparición, lo cual se habría previsto en el lote tratado.

Por otra parte, al evaluar la gravedad de las lesiones, se observó que existían diferencias significativas ( $p<0,05$ ) y altamente significativas ( $p<0,01$ ) en algunas de las localizaciones entre los lotes. En general, las lesiones más graves se situaron en los labios superiores derecho e izquierdo mientras que las menos graves fueron las de las encías, donde podría deberse a que fueron las lesiones de aparición más tardía (24 días) y al carácter autolimitante de la infección. El Lote 2 (grupo tratado) obtuvo medidas de gravedad significativamente más altas (“lesiones más graves”) en el LID, LII y en otras localizaciones como la nariz o la cara (Figura 5). La mayor gravedad en esas otras ubicaciones podría estar causada porque únicamente se aplicó el TS® en labios y encías, ya que cuando se trataron los corderos todavía no se veía la presencia de lesiones en estos otros lugares, aunque no justificaría la diferencia entre los lotes. Como se puede ver, existían lesiones de mayor gravedad en mayor número de localizaciones en el grupo tratado con Tri-Solfen®, al contrario de lo que cabría esperar tras la aplicación de este producto. En el estudio preliminar del empleo de Tri-Solfen® como tratamiento para corderos afectados por ectima contagioso (Lacasta et al., 2021), se estudió la progresión de la superficie de lesión, que podríamos comparar con la gravedad de la misma, y no se encontró disparidad entre ninguno de los tipos de lesión de los corderos tratados y los que permanecieron como control. Aunque también hay que considerar que el tamaño de muestra era más pequeño ( $n=14$ ), estando los individuos del grupo no tratado en menor proporción ( $n=3$ ) y pudiendo esto afectar de alguna forma a los resultados comparativos entre ambos.

Gravedad de las lesiones (1-5)									
LSD	Lote	Media	Desv. Típica	p	LII	Lote	Media	Desv. Típica	p
	1	1,810	1,712			1	0,760	1,239	
	2	1,670	1,717			2	0,970	1,423	
	Global	1,740	1,715	0,203		Global	0,865	1,331	0,046
LSI	Lote	Media	Desv. Típica	p	Encías	Lote	Media	Desv. Típica	p
	1	1,760	1,600			1	0,630	1,168	
	2	1,850	1,685			2	0,660	1,253	
	Global	1,805	1,643	0,574		Global	0,645	1,211	0,973
LID	Lote	Media	Desv. Típica	p	Otras	Lote	Media	Desv. Típica	p
	1	0,800	1,284			1	1,090	1,494	
	2	1,090	1,389			2	1,470	1,556	
	Global	0,945	1,337	<0,001		Global	1,280	1,525	<0,001

Figura 5. Tabla de análisis de varianzas de las medias de gravedad de las lesiones.

También se calificó la curación de las lesiones en la prueba realizada por Lenzele et al. (2021) para valorar la eficacia de los tratamientos frente a la fiebre aftosa y se observó que la evolución difería en los distintos grupos que formaban parte del estudio. Fue en los grupos tratados donde hubo recuperación, mientras que en el grupo control las erosiones persistieron. Además, los animales tratados con Tri-Solfen® obtuvieron puntuaciones más altas respecto a dicha curación a partir del día 9. Igualmente, se midió el tamaño de las lesiones y fue comprobado que el empleo del TS® reducía las mismas a un ritmo más rápido, llegando a desaparecer casi por completo. El virus de la fiebre aftosa (FMDV) provoca la presencia de vesículas mediante su propagación en las células córneas de la piel y la mucosa oral, que componen la capa más superficial del epitelio (Alexandersen et al., 2003). Sin embargo, el virus *orf* produce también modificaciones en estratos epiteliales más profundos como son la capa espinosa y la basal, llegando incluso a las células dérmicas (Nandi, De y Chowdhury, 2011). Esta clara distinción en la actuación de ambos virus podría suponer la causa de la ineficacia del tratamiento en el caso de los corderos afectados por EC, teniendo el TS® una menor penetración y con ello, una escasa o inexistente acción frente al virus *orf* permitiendo así la habitual progresión de las lesiones.

En definitiva, a pesar de que en este último experimento al que se ha hecho referencia se demostró la eficacia del Tri-Solfen®, con la heterogeneidad que presentaron los resultados del presente trabajo no se pudo afirmar que existieran distinciones positivas en los corderos tratados respecto a la progresión clínica de las lesiones de ectima contagioso. Otra de las posibles explicaciones sería la aplicación del TS® de manera demasiado temprana, al comienzo de la aparición de las primeras lesiones, ya que muchas de ellas surgieron en los días posteriores

al tratamiento. Es por eso por lo que deberían sucederse nuevas pruebas que ampliaran el tiempo de terapia y fueran capaces de determinar realmente si existe eficacia en el uso de este producto para la mejora de las lesiones de los corderos infectados por el virus *orf*.

### 5.3. HEMATOLOGÍAS

La interpretación del perfil hematológico en combinación con los hallazgos del examen clínico y los resultados de otras pruebas diagnósticas pueden apuntar a un diagnóstico diferencial específico o aproximar el pronóstico (Polizopoulou, 2010). Por esta razón, como parte de la monitorización general de los corderos durante el experimento, los resultados de las pruebas hematológicas podrían dar una idea del estado general y cómo afectaba al mismo la infección por el virus *orf* en los animales.

En referencia a los parámetros referidos a la serie roja medidos en el hemograma tales como los eritrocitos, el hematocrito, la hemoglobina, el volumen corpuscular medio (VCM), la hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), se encontraron dentro de los rangos de normalidad en todas las tomas de muestras y en todos los corderos analizados. Además, no se detectaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre ambos lotes en ninguno de los momentos.

La única excepción fueron los eritrocitos medidos en He0, donde se situaban ligeramente por debajo del límite inferior en ambos grupos, como se muestra en la Figura 6, y teniendo en cuenta que el valor de referencia en el ganado ovino se considera de 9,49 a 15,12M/ $\mu$ l. Esto puede ser debido a la temprana edad de los corderos en este primer muestreo (de aproximadamente 4 días). Palacios y Narváez, llevaron a cabo un estudio en 2018 en terneras mestizas ( $n=36$ ) de una explotación en Ecuador durante sus primeros seis meses de vida, en el que se comprobó que existían valores hematológicos, entre ellos el recuento de eritrocitos, en los animales jóvenes que diferían de los adultos de manera fisiológica, debido al tamaño de las células hemáticas y a la anemia por deficiencia de hierro que suelen sufrir los que reciben principalmente una nutrición basada en leche. Así pues, puede justificarse ese pequeño descenso en la cantidad de hematíes de los corderos, teniendo en cuenta que los rangos de referencia en las hematologías se dan para ovejas adultas y sin suponer ningún tipo de consecuencia clínica.

Eritrocitos (M/ $\mu$ l)	Lote	He0			
		Media	Desv. Típica	N	p
	1	8,2250	1,1362	24	
	2	8,5908	1,3226	26	
	Total	8,4152	1,2379	50	0,301

Figura 6. Tabla del análisis de varianzas de las medias de concentración de eritrocitos de los corderos en el momento He0 ( $p=0,301$ ). Los resultados de la concentración de eritrocitos de todas las hematologías están disponibles en el Anexo I.

Por otro lado, en cuanto al leucograma, el análisis en concentración y porcentaje de los leucocitos totales, neutrófilos segmentados, linfocitos y basófilos estaba dentro de los valores de referencia y entre ambos lotes no se apreciaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) en ninguno de los parámetros ni de los tiempos medidos. Como describe Medeiros Gomes Simplicio (2011) en el estudio sobre variaciones en el leucograma de rumiantes sanos y enfermos, en él no se presentó un aumento relevante del total de leucocitos, neutrófilos segmentados o linfocitos en los animales afectados por ectima contagioso, implicando que la respuesta leucocitaria fue estadísticamente similar a la presentada por las ovejas del grupo sano, lo cual concordaba con el carácter localizado de la respuesta inflamatoria propia de esta enfermedad, así como con los resultados de los corderos examinados en este experimento.

Los monocitos sí resultaron por encima de los valores normales (0,00 - 0,12 K/ $\mu$ l) en los dos grupos durante la He0 y la He1 (ambas previas al tratamiento con Tri-Solfen®), pero no había diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre ellos (Figura 7). La cadena de acciones que ocurren en la respuesta inmune inespecífica con el objetivo de minimizar la lesión de los tejidos se inicia con la activación de los macrófagos presentes en el tejido lesionado o a través de la liberación de una serie de mediadores químicos, como las citoquinas, dispensados por los monocitos y linfocitos sanguíneos (Medeiros Gomes Simplicio, 2011). Este hecho podría explicar la monocitosis registrada en los dos lotes de corderos y, especialmente en la He1, donde ya habían sido infectados y empezaban a presentar lesiones propias de EC, pero no habían recibido todavía el tratamiento, con lo que no existía ninguna diferenciación entre los grupos. Haciendo referencia al mismo estudio anteriormente mencionado (Medeiros Gomes Simplicio, 2011), el número de monocitos en las ovejas enfermas fue mucho mayor y más variable que el de las ovejas sanas, donde sólo un individuo presentó este tipo de células, siendo esto similar a lo obtenido en el presente trabajo.

Monocitos (K/ $\mu$ l)	He0				
	Lote	Media	Desv. Típica	N	p
	1	0,3104	0,4375	21	
	2	0,2610	0,3734	22	
	Total	0,2840	0,4029	43	0,547
	He1				
	Lote	Media	Desv. Típica	N	p
	1	0,3043	0,5923	21	

	2	0,2172	0,4278	21	
Total		0,2571	0,5157	42	0,476

Figura 7. Tabla del análisis de varianzas de las medias de concentración de monocitos de los corderos en la He0 y He1 ( $p>0,05$ ). Los resultados de la concentración de monocitos de todas las hematologías están disponibles en el Anexo II.

También en el recuento de los eosinófilos en concentración y porcentaje, a pesar de encontrarse dentro del rango de normalidad, existían diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre el Lote 1 y el Lote 2 en la He1 (pre-tratamiento) y la He3 (13 días post-tratamiento) (Figura 8). En ambos tiempos, fue el Lote 2 en el que se apreciaron valores medios mayores; es decir, el lote tratado tenía recuentos de eosinófilos significativamente más altos respecto al lote control. Ciertamente, los datos obtenidos en el estudio preliminar del empleo de Tri-Solfen® (Lacasta et al., 2021) se ajustan a los valores de eosinófilos medidos en este; ya que también se obtuvo que el grupo tratado tenía una media de este tipo celular dentro de los rangos, aunque mayor que el grupo que permaneció sin tratamiento, y esto suponía diferencias significativas ( $p<0,05$ ) entre ellos. Se considera que la eosinofilia está generalmente asociada a casos de hipersensibilidad como en el asma o en dermatitis (Soriano Cabré, 2016). A pesar de que, como se ha dicho, el recuento de eosinófilos era mayor en el Lote 2 pero sin existir eosinofilia, este podría estar asociado a las lesiones producidas por el virus *orf* (que implican dermatitis) o quizás a cierta reacción de hipersensibilidad local que pudiera generar la aplicación del TS® sobre la piel, lo cual justificaría las diferencias significativas entre ambos grupos.

		He1			
Eosinófilos (%)	Lote	Media	Desv. Típica	N	p
	1	0,9000	0,7314	21	
	2	2,0476	1,0930	21	
	Total	1,4738	1,0867	42	<0,001
Eosinófilos (K/ $\mu$ l)	Lote	Media	Desv. Típica	N	p
	1	0,0648	0,0530	21	
	2	0,1443	0,0822	21	
	Total	0,1045	0,0793	42	0,001
He3					
Eosinófilos (%)	Lote	Media	Desv. Típica	N	p
	1	0,5050	0,4536	20	
	2	1,4182	1,8446	22	
	Total	0,9833	1,4322	42	0,008
Eosinófilos (K/ $\mu$ l)	Lote	Media	Desv. Típica	N	p
	1	0,0415	0,0341	20	

	2	0,1350	0,2298	22	
	Total	0,0905	0,1727	42	0,043

Figura 8. Tabla del análisis de varianzas de las medias de eosinófilos de los corderos en la He1 y He3 ( $p<0,05$ ). Los resultados de los eosinófilos de todas las hematologías están disponibles en el Anexo III.

Finalmente, los parámetros plaquetarios tales como la concentración y el volumen plaquetario medio (VPM) estuvieron dentro de los valores de referencia y no se hallaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre las medias de los dos lotes.

#### 5.4. REAL-TIME PCR

Los resultados obtenidos en las pruebas Real-Time PCR a partir del hisopado de la boca de los corderos, se exponen a continuación en la Figura 9:

		Lote		Total	p
		1	2		
<b>H0</b>					
PCR Negativo	Recuento	24	21	45	
	% dentro de Lote	100,00%	100,00%	100,00%	
PCR Positivo	Recuento	0	0	0	
	% dentro de Lote	0,00%	0,00%	0,00%	
<b>H1</b>					
PCR Negativo	Recuento	17 <sub>a</sub>	16 <sub>a</sub>	33	0,685
	% dentro de Lote	70,80%	76,20%	73,30%	
PCR Positivo	Recuento	7 <sub>a</sub>	5 <sub>a</sub>	12	
	% dentro de Lote	29,20%	23,80%	26,70%	
<b>H2</b>					
PCR Negativo	Recuento	18 <sub>a</sub>	10 <sub>a</sub>	28	0,059
	% dentro de Lote	75,00%	47,60%	62,20%	
PCR Positivo	Recuento	6 <sub>a</sub>	11 <sub>a</sub>	17	
	% dentro de Lote	25,00%	52,40%	37,80%	
<b>H3</b>					
PCR Negativo	Recuento	24	21	45	
	% dentro de Lote	100,00%	100,00%	100,00%	
PCR Positivo	Recuento	0	0	0	
	% dentro de Lote	0,00%	0,00%	0,00%	

Figura 9. Tabla de recuento de los resultados de RT-PCR ( $p>0,05$ ). El subíndice <sub>a</sub> denota que las proporciones de columna no difieren de forma significativa.

En la primera toma de muestras (H0), previa a la infección experimental, no se encontró ningún resultado positivo en ninguno de los lotes, confirmando la ausencia del virus *orf* en los corderos y dándose así la condición necesaria para empezar el experimento.

En H1, una semana post-tratamiento, había de media un 73,3% de animales negativos en el conjunto de los dos lotes; mientras que en el Lote 1 (grupo control) había un total del 29,2% de positivos y en el Lote 2 (grupo tratado) un 23,8%. En este momento, el porcentaje de positivos era menor en el lote que había recibido tratamiento ( $p=0,685$ ). No obstante, siete días después (dos semanas post-tratamiento), en el H2, la tendencia cambió y el número de corderos positivos al virus *orf* del Lote 2 casi duplicaba al del Lote 1, con un 52,4% frente a un 25,0%, respectivamente ( $p=0,059$ ); además de que los positivos del grupo control se redujeron un 4% respecto a la semana anterior (H1). Finalmente, en el H3 a los 27 días tras la terapia, los resultados de los animales que quedaron posteriormente al sacrificio ( $n=10$ ), fueron en su totalidad de nuevo negativos en los dos lotes.

En ninguno de los tiempos en los que se realizó RT-PCR, se detectaron diferencias significativas entre los grupos. Asimismo, fue analizada la relación entre los datos de H1 y H2, por ser fechas con variabilidad de resultados, aunque no se reveló asociación dentro del Lote 1, del Lote 2 ni globalmente entre ellos. A pesar de que al final de las tomas de muestras los corderos volvían a ser negativos al virus *orf*, la falta de distinción entre ambos lotes implicaba que no podía atribuirse al tratamiento con Tri-Solfen® un efecto antiviral.

Haciendo alusión de nuevo a pruebas realizadas con el TS® para las lesiones de animales afectados por fiebre aftosa (Windsor et al., 2020), el primer enfoque intuyó propiedades potencialmente viricidas en el producto contra el FMDV si se aplicaba de forma temprana, ya que posee un pH ácido de 2,7. También la hipótesis se apoyaba en la probabilidad de que la lidocaína fuera igualmente viricida, puesto que ciertas concentraciones habían demostrado ese efecto contra herpes virus anteriormente (Haines et al., 1986; Windsor et al., 2020).

En cambio, en el ya referenciado estudio preliminar del uso de Tri-Solfen® en corderos con ectima contagioso (Lacasta et al., 2021) no se observaron diferencias significativas entre los animales tratados y los del grupo control, lo cual encaja con lo obtenido en el presente trabajo. Por lo tanto, se podría de nuevo dar explicación a estos resultados, haciendo referencia al modo de acción del virus *orf*, capaz de afectar a numerosas capas de la piel (dermis y epidermis) en contraposición a la capacidad de penetración del TS®, que podría ser insuficiente para llegar hasta ellas y ejercer así un posible efecto viricida, haciendo desaparecer el virus.

## 5.5. SEROLOGÍAS

En el estudio estadístico de los resultados serológicos, la serología inicial a la llegada de los animales (Se0) y la siguiente, a los 8 días de la inoculación del virus (Se1), dieron resultados negativos en todos los corderos analizados. La Se2 fue obtenida a los 21 días post-infección y todos los valores obtenidos tanto en 109+1 como en 109+1+2, también resultaron negativos; aunque en la dilución 109+1+2+3 había una muestra dudosa en el Lote 1. En la Se3, tras 28 días desde la infección experimental, el tamaño de muestra se redujo a los 10 corderos supervivientes (n=10) y el 100% de las muestras (Lotes 1 y 2) dieron lugar de igual modo a resultados negativos (Figura 10).

		109+1			109+1+2			109+1+2+3		
		Lote		Total	Lote		Total	Lote		Total
		1	2		1	2		1	2	
<b>Se0</b>										
Negativo	Recuento	25	25	50	25	25	50	25	25	50
	% dentro de Lote	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Dudoso	Recuento	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	% dentro de Lote	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Positivo	Recuento	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	% dentro de Lote	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>Se1</b>										
Negativo	Recuento	25	25	50	25	25	50	25	25	50
	% dentro de Lote	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Dudoso	Recuento	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	% dentro de Lote	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Positivo	Recuento	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	% dentro de Lote	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>Se2</b>										
Negativo	Recuento	12 <sub>a</sub>	13 <sub>a</sub>	25	12 <sub>a</sub>	14 <sub>a</sub>	26	11 <sub>a</sub>	14 <sub>a</sub>	25
	% dentro de Lote	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	91,70%	100,00%	96,20%
Dudoso	Recuento	0	0	0	0	0	0	1 <sub>a</sub>	0 <sub>a</sub>	1
	% dentro de Lote	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	8,30%	0,00%	3,80%
Positivo	Recuento	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	% dentro de Lote	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>Se3</b>										
Negativo	Recuento	5 <sub>a</sub>	4 <sub>a</sub>	9	5 <sub>a</sub>	4 <sub>a</sub>	9	5 <sub>a</sub>	5 <sub>a</sub>	10
	% dentro de Lote	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Dudoso	Recuento	0	0	0	0	0	0	1 <sub>a</sub>	0 <sub>a</sub>	1
	% dentro de Lote	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	8,30%	0,00%	3,80%
Positivo	Recuento	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	% dentro de Lote	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Figura 10. Tabla de recuento de los resultados serológicos en Se0, Se1, Se2 y Se3. El subíndice *a* denota que las proporciones de columna no difieren de forma significativa.

Los recuentos serológicos cambiaron en la Se4, a los 35 días post-infección, cuando los animales empezaron a mostrar resultados positivos, lo cual implicaba la aparición de anticuerpos detectables frente a ectima contagioso:

- En 109+1 todos los valores fueron negativos (100%).
- En 109+1+2 se encontró una muestra dudosa en el Lote 2, que representaba un 10% del total; mientras que otras dos muestras salieron positivas (una de cada lote), siendo un 20% del total, frente al 70% restante de muestras negativas.
- En 109+1+2+3 de nuevo se distinguieron individuos dudosos (uno en el Lote 2) así como positivos (uno en el Lote 1), que correspondían a un 20% respecto al total de muestras analizadas.

La Se4, a los 35 días post inoculación, por lo tanto, mostró el comienzo de la seroconversión de los corderos inoculados. Este hecho no había sido objeto de estudio anteriormente, por lo cual es este experimento el que ha sido capaz de determinar que la aparición de anticuerpos frente al EC empieza en torno a las 5 semanas después de que los animales hayan sido infectados experimentalmente (35 días post-infección). Estos resultados están en concordancia con el desarrollo de inmunidad mediante la vacunación con virus *orf* vivo atenuado, que se produce desde las 4 a las 8 semanas de haber recibido la vacuna (Small et al., 2019).

Por último, en la Se5, a los 42 días post-inoculación, las proporciones aparecieron muy similares al momento anterior (Se4), confirmando de nuevo la aparición de respuesta serológica:

- En 109+1+2 se observó un dudoso en el Lote 1, un positivo en el Lote 1 y otros dos en el Lote 2. Es decir, el 60% de las muestras eran negativas, el 10% dudosas y el 30% positivas.
- En 109+1+2+3 fueron detectadas dos muestras positivas, una en cada lote, que correspondían a un 20% del total. Además, como se ve en la Figura 11, dejó de haber resultados dudosos.

	109+1			109+1+2			109+1+2+3				
	Lote		Total	Lote		Total	p	Lote		Total	p
	1	2		1	2			1	2		
	Se4										
Recuento	5 <sub>a</sub>	5 <sub>a</sub>	10	4 <sub>a</sub>	3 <sub>a</sub>	7	0,565	4 <sub>a</sub>	3 <sub>a</sub>	7	0,368
% dentro de Lote	100,00%	100,00%	100,00%	80,00%	60,00%	70,00%		80,00%	60,00%	70,00%	
Recuento	0	0	0	0 <sub>a</sub>	1 <sub>a</sub>	1		0 <sub>a</sub>	1 <sub>a</sub>	1	
% dentro de Lote	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	20,00%	10,00%		0,00%	20,00%	10,00%	
Recuento	0	0	0	1 <sub>a</sub>	1 <sub>a</sub>	2		1 <sub>a</sub>	1 <sub>a</sub>	2	

% dentro de Lote	0,00%	0,00%	0,00%	20,00%	20,00%	20,00%		20,00%	20,00%	20,00%	
<b>Se5</b>											
Recuento	-	-	-	3 <sub>a</sub>	3 <sub>a</sub>	6		4 <sub>a</sub>	4 <sub>a</sub>	8	
% dentro de Lote	-	-	-	60,00%	60,00%	60,00%		80,00%	80,00%	80,00%	
Recuento	-	-	-	1 <sub>a</sub>	0 <sub>a</sub>	1		0	0	0	
% dentro de Lote	-	-	-	20,00%	0,00%	10,00%		0,00%	0,00%	0,00%	
Recuento	-	-	-	1 <sub>a</sub>	2 <sub>a</sub>	3		1 <sub>a</sub>	1 <sub>a</sub>	2	
% dentro de Lote	-	-	-	20,00%	40,00%	30,00%	0,513	20,00%	20,00%	20,00%	1,000

Figura 11. Tabla de recuento de los resultados serológicos en Se4 y Se5. El subíndice <sub>a</sub> denota que las proporciones de columna no difieren de forma significativa.

Se intuye así que la tendencia serológica en el tiempo se dirige hacia la disminución de los resultados negativos y dudosos, en favor de un mayor número de resultados positivos que se traducen en la aparición de anticuerpos frente a EC, es decir, en el desarrollo de la respuesta serológica de los corderos. Este suceso fue examinado en una experiencia en ovejas y cabras domésticas, así como en muflones de Dall (*Ovis dalli*) y en bueyes almizcleros (*Ovibos moschatus*) ubicados en Alaska (Zarnke et al., 1983). En ella, se estudió la aparición de respuesta serológica en los animales afectados por EC, así como su relación con el título de anticuerpos. Se vio que los animales domésticos del interior de Alaska (ovejas y cabras) poseían anticuerpos frente a EC, aunque con una prevalencia no muy alta y cuyos títulos indicaban que se debían a la exposición natural al virus y no a haber recibido vacunación. Por otro lado, a pesar de haber estado afectados por EC justo el año previo a la prueba, la mayoría de los bueyes almizcleros analizados carecían de títulos de anticuerpos significativos en suero, lo que implica que la disminución de este parámetro es aparentemente muy rápida (menor a un año) en este tipo de animales. Por el contrario, la prevalencia serológica y los títulos correspondientes eran altos en los muflones de Dall, en los cuales se habían observado signos de ectima contagioso anteriormente y en este caso se mantuvieron altos en dichos individuos que se habían considerado serológicamente positivos. Esta última situación parecía explicarse ya que el ambiente en el que se encontraban los animales aún estaba contaminado por el virus *orf* o porque habían quedado infecciones latentes que se reactivaban. En resumen, se pudo observar y comparar la seroprevalencia de individuos susceptibles a la enfermedad tanto domésticos como salvajes, así como aproximar la duración de su respuesta serológica. Sin embargo, en esta prueba tampoco se definió el momento en el que se produce la seroconversión tras la primoinfección.

En el presente trabajo, como queda también reflejado en la Figura 11, se comprobó que no existían diferencias significativas entre los lotes ( $p>0,050$ ), indicando, tal y como se podría prever, que no se puede atribuir al “efecto lote” (grupo tratado o grupo control) la aparición de

anticuerpos frente a ectima contagioso. Lo que sí se pudo determinar, en definitiva, fue el momento de seroconversión de los individuos infectados experimentalmente con el virus *orf*, que se da a partir de las 5 semanas tras la infección. A este hallazgo deberán seguirle estudios posteriores más extensos, en duración y tamaño de muestra, en los que se pueda valorar el momento en que la totalidad de los corderos hayan desarrollado su respuesta inmune y de esta manera, hablar del intervalo de tiempo en el que esto ocurre e incluso concretar la duración de la inmunidad para este tipo de animales.

## 6. CONCLUSIONES

1. En el aumento de peso progresivo de los corderos no se registraron diferencias significativas entre ambos lotes, por lo que este no se le puede atribuir al tratamiento con Tri-Solfen® ningún efecto a este respecto.
2. La aparición de las lesiones se dio aproximadamente de los 8 hasta los 24 días post-inoculación, ubicándose en los labios superiores las primeras y en las encías las más tardías. Además, no pudo determinarse la eficacia del Tri-Solfen® para impedir la aparición de las lesiones ni para mejorar su progresión clínica.
3. Los parámetros hematológicos fueron acordes a los valores de referencia en términos generales. Sin embargo, se detectó monocitosis inicial en ambos lotes, a causa de la respuesta inmune inespecífica como consecuencia de las lesiones; así como un recuento de eosinófilos significativamente más alto en el lote tratado con Tri-Solfen®, probablemente asociado también a las lesiones o a una reacción local frente al tratamiento tópico.
4. Las pruebas RT-PCR, demostraron la presencia del virus tras la infección experimental en ambos grupos hasta el último muestreo realizado 27 días post-tratamiento, donde todos los corderos resultaron negativos. No se observaron diferencias significativas en el número de animales positivos entre el grupo tratado y el grupo control.
5. El momento de seroconversión frente al ectima contagioso comienza alrededor de las cinco semanas de la infección experimental con el virus *orf* (35 días post-infección).

## 6. CONCLUSIONS

1. In the progressive weight gain of the lambs, there were no significant differences between the two batches. Any effect can be attributed to the treatment with Tri-Solfen® in the weight gain.

2. The appearance of the lesions occurred approximately from 8 to 24 days post-inoculation, located in the upper lips the first and in the gums the later. In addition, the efficacy of Tri-Solfen® in preventing the appearance of lesions or in improving their clinical progression could not be determined.
3. The haematological parameters were most of the time within the reference values. However, initial monocytosis was detected in both batches due to the non-specific immune response as a result of the lesions; as well as a significantly higher eosinophil count in the batch treated with Tri-Solfen®, probably also associated with lesions or a local reaction to topical treatment.
4. RT-PCR tests demonstrated the presence of the virus after experimental infection in both groups until the last sampling, carried out 27 days post-treatment, where all lambs were negative. No significant differences in the number of positive animals were observed between the treated group and the control group.
5. The time of seroconversion against contagious ecthyma begins around five weeks after experimental infection with the *orf* virus (35 days post-infection).

## 7. VALORACIÓN PERSONAL

En mi opinión, este trabajo me ha permitido introducirme ligeramente en el mundo de la investigación, participando en las tareas diarias, las tomas de muestras y el seguimiento de los corderos participantes en el experimento, ampliando con ello el manejo y el conocimiento sobre el ganado ovino. También ha desarrollado mis habilidades para buscar bibliografía científica, filtrar su contenido y poder plasmarlo en la redacción; además de que he podido asimilar nociones básicas de ordenación de datos y estadística. Todo lo cual espero que pueda utilizar en mi futura vida laboral.

Así concluyen cinco años de mucho estudio y dedicación, de manera intensa, pero aprendiendo a cada momento. Mis agradecimientos se dirigen a mis tutoras, por la paciencia y haberme acompañado hasta el final, a Teresa Tejedor, por su predisposición y su colaboración en el estudio estadístico y al equipo del SCRUM, por habernos ayudado durante todo el proyecto y formar una gran familia.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Alcaide Alonso, M. y Rodríguez Doce, R. (2016). "Ectima contagioso, algo más que boqueras". *Badajoz veterinaria*, 5, pp. 6-10. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7210003> [Consultado 18-07-22].
- Alexandersen, S., Zhang, Z., Donaldson, A.I. and Garland, A.J.M. (2003). 'The Pathogenesis and Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease'. *Journal of Comparative Pathology*, 129, pp. 1-36. DOI: 10.1016/S0021-9975(03)00041-0
- Bergqvist, C., Kurban, M. and Abbas, O. (2017). 'Orf virus infection'. *Reviews in medical virology*, 27(4), e1932. DOI: 0.1002/rmv.1932
- Bhanuprakash, V., Indrani, B. K., Hosamani, M. and Singh, R. K. (2006). 'The current status of sheep pox disease'. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 29(1), pp. 27-60. DOI: 10.1016/j.cimid.2005.12.001
- Center for Food Security & Public Health (CFSPH). (2015). Contagious Ecthyma. Disponible en: [https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/contagious\\_ecthyma.pdf](https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/contagious_ecthyma.pdf) [Consultado 28-07-2022].
- Darbyshire, J.H. (1961). 'A fatal ulcerative mucosal condition of sheep associated with the virus of contagious pustular dermatitis'. *British Veterinary Journal*, 117, pp. 97–105.
- 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.
- Eisa, M., Tagel Deen, M.H. and Omer, E.A. (1985). 'An outbreak of contagious ecthyma in sheep and goats in the Sudan'. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, 33, pp. 169–170.
- Erasmus, B.J. (1975). 'Bluetongue in sheep and goats'. *Australian Veterinary Journal*, 51, pp. 165–170.
- Fernández, M. (2019). "Limpieza y desinfección en explotaciones ganaderas". *Mundo Ganadero*, mayo/junio 2019, pp. 36-40. Disponible en: [https://www.agronegocios.es/wp-content/uploads/2019/07/Limpieza-y-desinfecci%C3%B3n-en-explotaciones\\_MG288.pdf](https://www.agronegocios.es/wp-content/uploads/2019/07/Limpieza-y-desinfecci%C3%B3n-en-explotaciones_MG288.pdf) [Consultado 28-08-2022].
- 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.

Gumbrell, R.C. and McGregor, D.A. (1997). 'Outbreak of severe fatal orf in lambs'. *Veterinary Record*, 141, pp. 150–151.

Haig, D. M. and McInnes, C. J. (2002). 'Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus orf virus'. *Virus research*, 88(1-2), pp. 3-16. Disponible en: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016817020200117X?casa\\_token=r9F3kWmfB8EAAAAA:SZ9LF2bB7HxEkW8el3e4U6amm21mpN7hjCmQ4weiQi5c8TkJimA7M4Tz9iOG5NdMwfHrK-My1w](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016817020200117X?casa_token=r9F3kWmfB8EAAAAA:SZ9LF2bB7HxEkW8el3e4U6amm21mpN7hjCmQ4weiQi5c8TkJimA7M4Tz9iOG5NdMwfHrK-My1w) [Consultado 10-07-2022].

Hawkins, C.D., Ellis, T.M., Davies, M.K., Peet, R.L. and Parkinson, J. (1991). 'An unusual outbreak of contagious ovine ecthyma'. *Australian Veterinary Journal*, 68, pp. 210–211.

Housawi, F.M.T., Roberts, G.M., Gilray, J.A., Pow, I., Reid, H.W., Nettleton, P.F., Sumption, K.J., Himba, M.H. and Mercer, A.A. (1998). 'The reactivity of monoclonal antibody against orf virus with other parapoxviruses and the identification of a 39 kDa immunodominant protein'. *Archives of Virology*, 143, pp. 2289–2303.

Lacasta, D., Reina, R., Ruiz de Arcaute, M., Ferrer, L. M., Benito, A. A., Tejedor, M. T., Echeverria, I., Ruiz, H., Martínez Cárdenas S. and Windsor, P. A. (2021). 'Effect of a Topical Formulation on Infective Viral Load in Lambs Naturally Infected with Orf Virus'. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 12, pp. 149. DOI: 10.2147/VMRR.S306355

Lance, W., Adrian, W. and Widhalm, B. (1981). 'An epizootic of contagious ecthyma in rocky mountain bighorn sheep in Colorado'. *Journal of Wildlife Diseases*, 17, 601–603.

Lefevre, P.C. and Diallo, A. (1990). 'Pest of small ruminants'. *Scientist review and International Technical Office of Epizootic Diseases*, 9, pp. 951–965.

Leite-Browning, M. (2008). *Contagious ecthyma (Orf/Sore Mouth) in sheep and goats*. Disponible en: <https://ssl.acesag.auburn.edu/pubs/docs/U/UNP-0063/UNP-0063-archive.pdf> [Consultado 21-07-2022].

Lendzele, S., Mavoungou, J., Burinyuy, K., Armel, K., Dickmu, S., Young, J., Thomson, P. and Windsor, P. (2021). 'Efficacy and application of a novel topical anaesthetic wound formulation for treating cattle with Foot-and-Mouth disease: A field trial in Cameroon'. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(4), pp. 2531-2542.

Lovatt, F. (2013). 'The Cost of Orf'. *Sheep Farmer*, January 2013, pp.18-19. Disponible en: [https://xlvets-farm.co.uk/sites/xlfarmpublic.co.uk/files/sa-site/press-articles/Sheep\\_Farmer\\_Jan\\_2013\\_LR\\_0.pdf](https://xlvets-farm.co.uk/sites/xlfarmpublic.co.uk/files/sa-site/press-articles/Sheep_Farmer_Jan_2013_LR_0.pdf) [Consultado 21-07-2022].

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.

Matthews, J.G. (2013). *Diseases of the Goat*. (3rd ed.) Chichester: Wiley.

McElroy, M. C., and Bassett, H. F. (2007). 'The development of oral lesions in lambs naturally infected with orf virus'. *The Veterinary Journal*, 174(3), pp. 663-664.

Medeiros Gomes Simplicio, K. M. (2011). *Leucograma e proteínas de fase aguda de ruminantes domésticos sadios e enfermos*. Mestrado. Universidade Estadual Paulista.

Mercer, A.A. and Haig, D.M. (1999). 'Parapox virus'. En: Granoff, A., Webster, R.G. (Eds.). *The Encyclopaedia of Virology*. New York: Academic Press.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). (2021). Sector ovino y caprino. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/ovino-caprino/default.aspx#ancla0> [Consultado 18-07-2022].

Moss, B. (1996). 'Poxviridae: the viruses and their replication'. En: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven.

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, pp. 73–82.

Palacios, T.E. y Narváez, J.A. (2018). "Estudio exploratorio de valores hematológicos en terneras Holstein Frisian mestizas, durante los primeros seis meses de vida". *Maskana*, 9(1), pp. 51-58. DOI: 10.18537/mskn.09.01.06

Polizopoulou, Z.S. (2010). 'Haematological tests in sheep health management'. *Small Ruminant Research*, 92, pp. 88-91. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2010.04.015

Roberts, C. D. and Windsor, P. A. (2019). 'Innovative pain management solutions in animals may provide improved wound pain reduction during debridement in humans: An opinion informed by veterinary literature'. *International Wound Journal*, 16(4), pp. 968-973.

Robinson, A.J. and Balassu, T.C. (1981). 'Contagious pustular dermatitis orf'. *The Veterinary Bulletin*, 51, pp. 771–782.

Sheil, M., Chambers, M., Polkinghorne, A., and Sharpe, B. (2021). 'Topical Application of Lidocaine and Bupivacaine to Disbudding Wounds in Dairy Calves: Safety, Toxicology and Wound Healing'. *Animals*, 11(3), pp. 869.

Small, S., Cresswell, L., Lovatt, F., Gummery, E., Onyango, J., McQuilkin, C. and Wapenaar, W. (2019). 'Do UK sheep farmers use orf vaccine correctly and could their vaccination strategy affect vaccine efficacy?'. *Veterinary Record*, 185(10), pp. 305. DOI: 10.1136/vr.105472

Smith, B. P. (2015). *Large animal internal medicine*. Missouri: Elsevier Health Sciences.

Soriano Cabré, M. (2016). *Estudio de las alteraciones hematológicas en ovejas afectadas por diferentes patologías*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza.

Spyrou, V. and Valiakos, G. (2015). 'Orf virus infection in sheep or goats'. *Veterinary Microbiology*, 181, pp. 178-182.

Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. (2020). "Caracterización del sector ovino y caprino en España: orientación productiva carne". *Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado*. Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/caracterizacionovinoycaprinocarnedatos20202docx\\_tcm30-579776.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/caracterizacionovinoycaprinocarnedatos20202docx_tcm30-579776.pdf) [Consultado 18-07-2022].

Watson, P. (2002). 'The differential diagnosis of FMD in sheep in the UK in 2001'. *State Veterinary Journal*, 12, pp. 20–24.

Windsor, P.A., Lomax, S. and White, P. (2016). 'Pain management for improved small ruminant welfare'. *Small Ruminant Research*, 142, pp. 55-57.

Windsor, P.A., Nampanya, S., Tagger, A., Keonam, K., Gerasimova, M., Putthana, V., Bush, R.D. and Khounsy, S. (2017). 'Is orf infection a risk to expanding goat production in developing countries? A study from Lao PDR'. *Small Ruminant Research*, 154, pp. 123-128.

Windsor, P.A., Khounsy, S., Earp, F., MacPhillamy, I., Young, J. and Bush, R. (2020). 'Managing welfare and antimicrobial-resistance issues in treating foot-and-mouth disease lesions: a new therapeutic approach'. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 11, pp. 99.

Zarnke, R.L., Dieterich, R.A., Neiland, K. A. and Ranglack, G. (1983). 'Serologic and experimental investigations of contagious ecthyma in Alaska'. *Journal of Wildlife Diseases*, 19(3), pp. 170-174.