



EL AISLAMIENTO DE LAS PRIMERAS ESTIRPES ESPAÑOLAS DEL VIRUS DEL ECTIMA CONTAGIOSO POSIBILITA EL DISEÑO DE TEST DIAGNÓSTICOS Y NUEVAS VACUNAS

El desarrollo de nuevas vacunas como las basadas en vectores virales que eviten la recurrencia de la infección es fundamental para el control del ectima contagioso y el sostenimiento de la actividad ganadera.

Javier Moleres¹, Andrea Lacalle¹, Irache Echeverría¹, Jesús Ochoa², Jesús Sayés², Pedro Pérez Ibáñez², Miguel Ángel Martínez de Eulate², Itziar Hualde², Jesús Mari Lasarte², Patxi Lazkanotegi², Mikel Nazabal² y Ramsés Reina¹

¹Instituto de Agrobiotecnología (CSIC-Gobierno de Navarra)

²Instituto Navarro de Tecnología e Industria Agroalimentaria (INTIA)
Imágenes cedidas por los autores

El ectima contagioso (EC), causado por el virus ORF (ORFV), es una enfermedad cutánea altamente contagiosa y de carácter zoonótico que afecta principalmente al ganado ovino y caprino (Spyrou y Valiakos, 2015). Las lesiones características se presentan fundamentalmente en los bordes mucocutáneos de la cara y la boca (Faridi y Ahmed, 2021), provocando que los animales reduzcan considerablemente la ingestión de alimentos y eventualmente la anulen, pudiéndose presentar muertes por inanición, especialmente en animales jóvenes. También puede afectar a pezones, genitales y más raramente a toda la piel. En su presentación clínica más frecuente, la enfermedad cursa con una elevada morbilidad (hasta del 100 %) y con una baja mortalidad (menos del 5 %) (Haig y McInnes, 2002).

La prevención frente al EC es un aspecto clave para evitar las pérdidas económicas en las ganaderías y maximizar la rentabilidad de las explotaciones. Las pérdidas se traducen, además del mencionado menor peso de los corderos por la dificultad para alimentarse, en la muerte de animales jóvenes, retraso en el crecimiento y aumento de la mano de obra y del gasto sanitario para tratar las infecciones secundarias. El diagnóstico clínico resulta sencillo cuando el cuadro lesional es bucal, sin embargo, es menos evidente en el resto de formas clínicas y habitualmente pasan desapercibidas. El diagnóstico en el laboratorio es fundamental para confirmar la presencia del ORFV en el rebaño y una mejor evaluación de la influencia de la infección en las explotaciones.

Las estimaciones indican que un 10 % de las explotaciones del Reino Unido se encuentran afectadas por brotes recurrentes de la enfermedad, indicando que la importancia económica de la enfermedad ha sido subestimada. Sin embargo, no existen estudios en nuestro entorno más cercano que evalúen la extensión de la enfermedad y sus repercusiones sobre la sanidad animal o la economía.

El control de la infección consiste tradicionalmente en la administración de vacunas vivas atenuadas, que han dejado de estar disponibles en nuestro país. La inmunidad que se induce es temporal y está poco caracterizada ya que los animales vacunados pueden reinfectarse y desarrollar la enfermedad, generalmente de manera más leve. Las estirpes virales que se emplean en este tipo de vacunas no están completamente caracterizadas desde el punto de vista genético, como tampoco lo está la atenuación derivada del cultivo *in vitro*. Mediante pases en células en cultivo, el ORFV pierde segmentos genéticos, normalmente de los extremos, que le confieren el carácter atenuado (Pye, 1990). Sin embargo, estos genes perdidos podrían ser importantes para la respuesta inmunitaria y para la inducción de inmunidad esterilizante.

El ORFV pertenece al género parapoxvirus, dentro de la familia de los poxvirus donde se encuentran virus como el Vaccinia, el monkeypoxvirus o el virus de la viruela. El contenido génico va más allá de los 120 genes, incluyendo información para modificar el patrón de citoquinas que expresa el hospedador, modificando su respuesta inmunitaria en favor de la replicación del virus. Algunos autores sugieren que esta es la base de la aparición recurrente de EC en los rebaños, independientemente de la ocurrencia de infecciones previas o vacunación. Se conocen hasta la fecha 17 estirpes del ORFV, cuyo genoma ha sido completamente secuenciado, mayoritariamente procedentes de China. Las relaciones filogenéticas indican que existe una gran heterogeneidad, sin embargo, pueden diferenciarse dos grandes linajes, uno

formado por aislados mayoritariamente asiáticos, y el otro por aislados procedentes de Europa. El número de secuencias parciales disponibles es mayor, lo que facilita el estudio de la variabilidad, sin embargo, no existen aislados ni secuencias que describan las estirpes circulantes en nuestro país.

La presencia de anticuerpos frente al ORFV se ha constatado tras infecciones experimentales, aunque su papel está por esclarecer. Los anticuerpos séricos podrían indicar que un individuo se encuentra infectado en estadios previos o posteriores a la aparición de la enfermedad. Alternativamente, aunque poco probable, la presencia de anticuerpos podría indicar inmunidad y protección frente a la enfermedad.

En la actualidad no existen métodos diagnósticos serológicos para la detección de animales infectados, y los moleculares están restringidos al ámbito de la investigación. Por un lado, los métodos moleculares se fundamentan en la detección de ADN viral a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos métodos son muy fiables, pero no constituyen un método predictivo de la enfermedad, sino que se emplean en la confirmación del origen de los signos clínicos. Por otro lado, los métodos serológicos se basan en la presencia de anticuerpos específicos generados por el hospedador contra antígenos del virus. El método serológico más ampliamente empleado es ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), en el que se depositan antígenos del propio virus y se detecta la presencia de anticuerpos en el suero de los animales.

En este estudio se han aislado y caracterizado genéticamente las primeras estirpes de virus ORF a partir de animales enfermos procedentes de distintas explotaciones ovinas de España. La amplificación de determinados genes del ORFV mediante PCR fue exitosa y las secuencias indican un grado de divergencia superior al considerado previamente. El estudio de las secuencias procedentes de aislados españoles ha permitido diseñar test ELISA con los que evaluar la producción de anticuerpos en rebaños ovinos. Además, la identificación de zonas inmunogénicas en el genoma de los ORFV podría contribuir al desarrollo de nuevas estrategias de inmunización.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE ESTIRPES ESPAÑOLAS

A través de la colaboración con ganaderos y veterinarios de diversos puntos del territorio nacional los autores han tenido acceso a muestras provenientes de rebaños con brotes de EC. Mediante liofilización con nitrógeno líquido y cultivo sucesivo en células

VERO y A549 se obtuvieron los primeros aislados. La presencia de virus se confirmó mediante análisis de proteínas por Western Blot empleando suero de animales infectados como anticuerpo primario (figura 1) y mediante PCR de diferentes genes.

La caracterización genética de los aislados, mediante PCR, clonación y secuenciación de los genes B2L, VIR, VIL10, Orf132 y Orf109 ha permitido conocer la variabilidad en las distintas regiones de los aislados de nuestro país, pudiendo establecer las primeras relaciones filogenéticas.

Sorprendentemente, las estirpes de ORF aisladas y secuenciadas en nuestro país (figura 2) se encuentran más relacionadas con estirpes asiáticas que con europeas.

Además, tras un análisis más en profundidad, se han identificado regiones con un buen perfil inmunogénico que podrían ser de utilidad en el diseño de test serológicos o como inóculo en el desarrollo de vacunas.

DISEÑO DE TEST ELISA COMO MÉTODO DE DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN POR ORFV

El empleo de técnicas serológicas para la detección de infecciones víricas está ampliamente extendido tanto en el ámbito médico, como en el veterinario (De Marco Verissimo *et al.*, 2021, Mohanty, 2021, Zhuge, 2021). En la actualidad, en España existe un único test ELISA sándwich con anticuerpos monoclonales anti-ORFV (Ovejero, CIDsA, 2015). Este test está diseñado para la detección del virus en las lesiones presentes en animales afectados y, por tanto, sin capacidad de predecir la presencia de la infección en rebaños que aún no presenten signos clínicos evidentes.

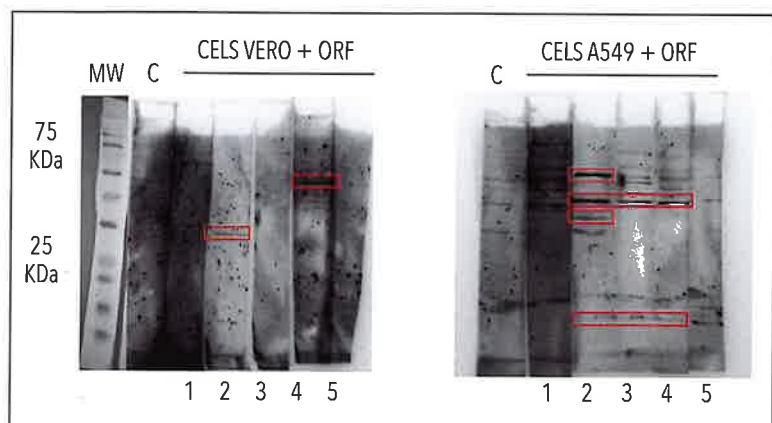


FIGURA 1. Western blot para la detección de anticuerpos en animales control (C) e infectados (1-5) frente a ORFV navarros aislados en células VERO o A549. Se evidencian las bandas que pueden corresponder a proteínas virales, entre ellas B2L, que presentan un peso molecular de 45KDa.

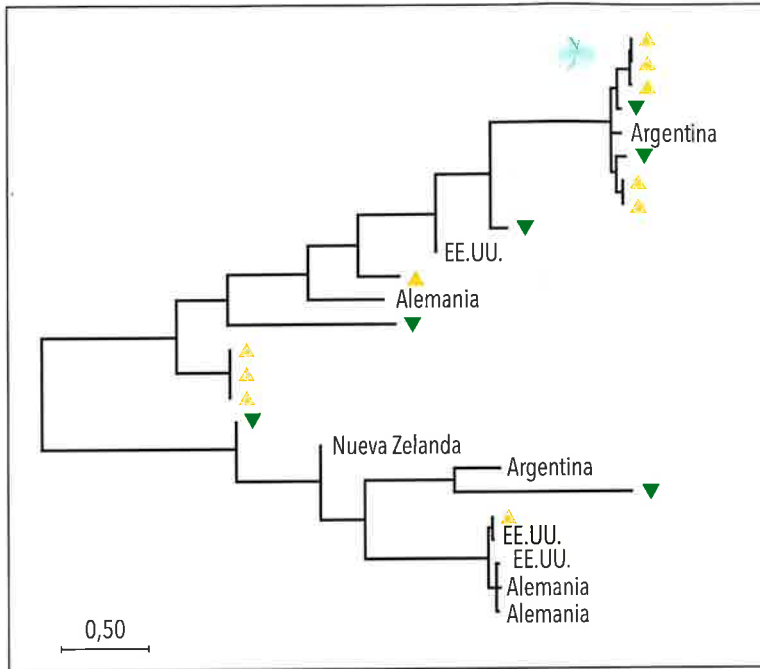


FIGURA 2. Árbol representativo de las relaciones filogenéticas del gen Orf109 de ORFV secuenciados hasta la fecha. Las estirpes españolas se muestran con triángulo invertido verde. Con triángulo amarillo se representan las estirpes aisladas en China. Construido empleando el método de máxima verosimilitud con el modelo basado en matrices JTT.

los autores han diseñado un test ELISA teniendo en cuenta la variabilidad genética existente en el territorio nacional. Para ello, realizaron un estudio *in silico* con el que identificar regiones inmunogénicas del virus. Tras analizar parámetros como la hidrofobicidad, el índice antigénico, la localización superficial y la probabilidad de pertenecer a un epítipo B, se seleccionó la proteína de superficie codificada por el gen Orf109 en el genoma de ORFV como base antigénica del test ELISA para la detección de la infección (figura 3).

En la actualidad no existen métodos diagnósticos serológicos para la detección de animales infectados, y los moleculares están restringidos al ámbito de la investigación.

Con el fin de poder evaluar la respuesta de anticuerpos como elemento diagnóstico predictivo de la infección, posibilitar estudios de seroprevalencia a distintos niveles y estudiar la importancia de la respuesta humoral frente a la infección por ORFV

MUESTREO SEROLÓGICO EN UN REBAÑO AFECTADO

Tras la identificación de las zonas inmunogénicas, el diseño y la síntesis de péptidos sintéticos que cubren dichas zonas de los genes B2L y Orf109 se optimizó

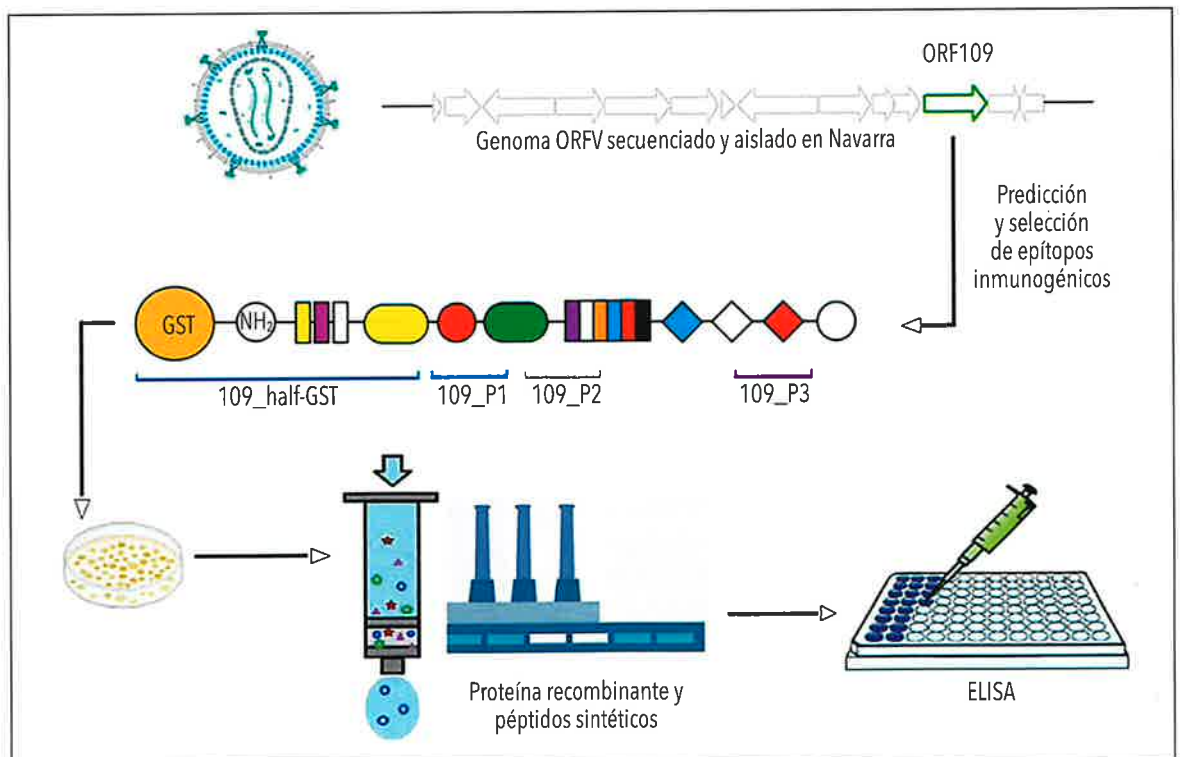


FIGURA 3. Esquema del diseño de un test ELISA para la detección de anticuerpos frente al ORFV.

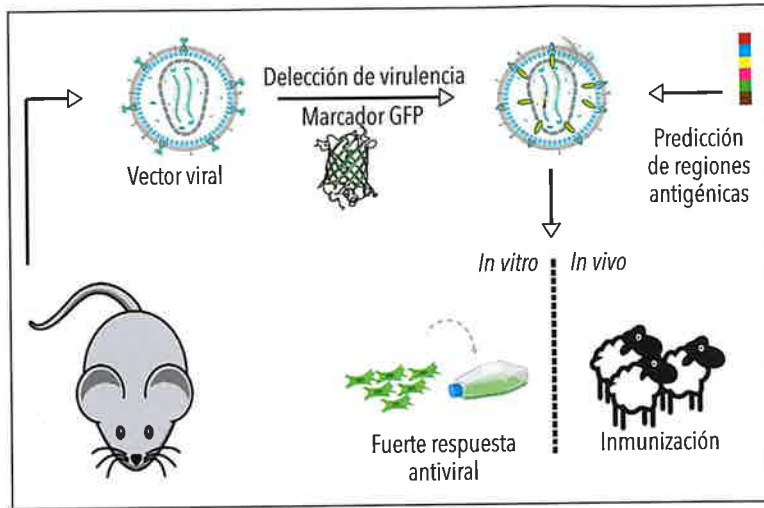


FIGURA 4. Diseño experimental del desarrollo de un candidato vacunal contra el ORFV causante del ectima contagioso. Fuente: De Pablo et al., 2020.

un protocolo ELISA con el que analizar sueros procedentes de un rebaño con brotes naturales. En el transcurso del brote (año 2018) se detectó un 87,5 % de animales seropositivos y, un año más tarde, la seropositividad había caído hasta el 6,25 %, indicando la capacidad de detección del método desarrollado. La presencia de animales con anticuerpos en ausencia de lesiones podría abrir la ventana al empleo de métodos serológicos para la identificación de animales portadores de la infección.

DISEÑO DE VACUNAS FRENTE AL ECTIMA CONTAGIOSO

El diseño de vacunas ha experimentado una auténtica revolución con la aplicación masiva de vacunas ARN o basadas en vectores virales para la inmunización de la población frente al SARS-CoV-2, aunque el empleo de este tipo de vacunas ha sido puesto a punto y optimizado en el marco de las infecciones animales (Pardi et al., 2018). Los vectores virales son

herramientas muy eficientes a la hora de establecerse y transmitir las proteínas inmunogénicas al hospedador. Además, debido a la presencia de patrones moleculares inductores de respuestas innatas, los vectores virales actúan *per se* como adyuvantes.

Resultados previos de los autores indican que los vectores virales basados en el virus murino Sendai inducen un estado antiviral en las células ovinas que podrían proteger frente a la infección con virus ovinos (De Pablo-Maiso et al., 2020). Además, la infección *in vivo* con vectores Sendai es efectiva dando lugar a una alta expresión de proteína (Griesenbach et al., 2011). ●

PERSPECTIVAS EN EL CONTROL DEL ECTIMA CONTAGIOSO

En la actualidad poco se conoce sobre la dinámica de la infección por ORFV y su relación con la respuesta humoral o celular del hospedador. Además, las herramientas diagnósticas disponibles son muy limitadas, así como las opciones vacunales. Los continuos brotes de EC, incluso en rebaños vacunados, y la fragilidad del sistema ganadero obligan al desarrollo de herramientas de control. La capacidad de identificar animales infectados con independencia de la aparición de signos, así como la realización de estudios de prevalencia posibilitarán entrever la importancia de la infección en nuestros sistemas productivos. El control definitivo de la infección podría alcanzarse una vez se desarrollen nuevas vacunas capaces de evitar las infecciones recurrentes, como por ejemplo las basadas en vectores virales. El control de las enfermedades animales, en especial aquellas zoonóticas, es esencial en el concepto de salud única y en el sostenimiento de la actividad ganadera aumentando la competitividad del sector ganadero.

BIBLIOGRAFÍA

- Spyrou, V., and G. Valiakos, 2015 Orf virus infection in sheep or goats. *Vet Microbiol* 181: 178-182.
- Faridi, W., and K. Ahmed, 2021 Orf Disease in StatPearls. StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC., Treasure Island (FL).
- Haig, D. M., and C. J. McInnes, 2002 Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus orf virus. *Virus Res* 88: 3-16.
- Pye, D., 1990 Vaccination of sheep with cell culture grown orf virus. *Aust Vet J* 67: 182-186
- De Marco Verissimo, C., C. O'Brien, J. López Corrales, A. Dorey, K. Cwiklinski et al., 2021 Improved diagnosis of SARS-CoV-2 by using nucleoprotein and spike protein fragment 2 in quantitative dual ELISA tests. *Epidemiol Infect* 149: e140.
- Mohanty N.N., Hemadri D., Munivenkatarayappa A., Shetty N., Subramanyam V., Biswas S.K., Chanda M. and M.Shivachandra S. B. 2021 Development of recombinant NS1-NS3 antigen based indirect ELISA for detection of bluetongue antibodies in sheep. *J Immunol Methods* 490: 112959.
- Zhuge Y., Ding C., Gong X., Hu D., Zhu J. and Wang C. 2021 Development and evaluation of two different double-antibody sandwich ELISAs for detecting severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection. *Jpn J Infect Dis*.
- Pardi N., Hogan M. J., Porter F. W. and Weissman D 2018 mRNA vaccines – a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery* 17, 4: 261-279.
- de Pablo-Maiso L, Echeverría I, Rius-Rocafort S., Luján L, Garcin D, de Andrés D, Nistal-Villán E. And Reina R. 2020 Sendai virus, a strong inducer of anti-lentiviral state in ovine cells. *Vaccines* 2020, 8(2), 206.
- Griesenbach U., McLachlan G., Owaki T., Somerton L, Shu T., Baker A, Tennant P, Gordon C., Vrettou C., Baker E., Collie D.D.S., Hasegawa M. and Alton E.W.F.W. 2011 Validation of recombinant Sendai virus in a non-natural host model. *Gene Therapy* volume 18, pages182-188