

# DERMATOSIS NODULAR CONTAGIOSA

---

### RESUMEN

**Descripción de la enfermedad:** La dermatosis nodular contagiosa (DNC) es una enfermedad del ganado bovino causada por un poxvirus, la cual se caracteriza por fiebre, nódulos en la piel, en las mucosas y en los órganos internos, caquexia, aumento de tamaño de los ganglios linfáticos, edema cutáneo y, a veces, la muerte. La enfermedad tiene importancia económica porque causa un descenso temporal en la producción de leche, esterilidad temporal o irreversible en los toros, daños en la piel y, ocasionalmente, la muerte. Distintas cepas de capripoxvirus son responsables de esta enfermedad, que son antigénicamente indistinguibles de las que causan la viruela de la oveja y de la cabra, pero claramente distintas a nivel genético. La DNC tiene una distribución geográfica en parte distinta a la de la viruela ovina y caprina, lo cual sugiere que las cepas bovinas de capripoxvirus no infectan ni se transmiten a las ovejas y las cabras. Se estima que la transmisión del virus productor de la DNC se efectúa predominantemente por medio de los artrópodos, y que la transmisión natural por contacto, en ausencia de vectores, es ineficaz. La dermatosis nodular contagiosa es endémica en muchos países africanos y de Oriente Medio. Entre 2012 y 2022, la DNC se diseminó al sureste de Europa, los Balcanes, Rusia y Asia como parte de la epidemia euroasiática de esta enfermedad.

**Anatomopatología:** Los nódulos son duros y pueden llegar a afectar el tejido subcutáneo y el músculo. Las lesiones histopatológicas agudas más importantes son alteraciones vacuolares epidérmicas con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos y vasculitis dérmica. Las lesiones histológicas crónicas más importantes son fibrosis y secuestros necróticos.

**Detección del agente patógeno:** La confirmación de laboratorio más rápida de la DNC se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real o convencional específica de capripoxvirus junto con unos antecedentes clínicos de enfermedad cutánea nodular generalizada y de aumento de los ganglios linfáticos superficiales en ganado bovino. A nivel ultraestructural, los viriones de capripoxvirus se diferencian claramente de los de parapoxvirus, que causan estomatitis papular bovina y pseudoviruela bovina, pero no pueden distinguirse morfológicamente de los viriones de ortopoxvirus, incluidos el virus de la viruela bovina y virus de la vaccinia, ambos posibles causas de enfermedad en el ganado bovino, aunque ninguno de los dos causa infección generalizada y ambos son poco frecuentes en el ganado bovino. El virus de la DNC crece en cultivo tisular de origen bovino, ovino o caprino. En cultivo celular, el VDNC causa un efecto citopático y unos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos característicos que se diferencian claramente de una infección por el herpesvirus bovino tipo 2, que causa pseudodermatitis nodular y produce cuerpos de inclusión intranucleares en cultivo celular. Los antígenos de capripoxvirus se pueden observar en cultivo tisular utilizando tinción por inmunoperoxidasa o inmunofluorescencia y el virus se puede neutralizar utilizando antisueros específicos.

Se han publicado varias PCR convencionales y en tiempo real, así como pruebas de amplificación isotérmica con cebadores específicos de capripoxvirus, para ser utilizados en distintos tipos de muestras.

**Pruebas serológicas:** La prueba de neutralización vírica (VN) y el enzimoanálisis (ELISA) se utilizan mucho y están validados. Las pruebas de inmunodifusión en gel de agar y las de inmunofluorescencia indirecta son menos específicas que la VN debido a las reacciones cruzadas con anticuerpos frente a otros poxvirus. La técnica de la inmunoelectrotransferencia utilizando la reacción entre el antígeno P32 del virus de la DNC con sueros problema es sensible y específica, pero de realización difícil y cara.

**Requisitos para las vacunas:** Todas las cepas de capripoxvirus examinadas hasta la fecha, ya sean derivadas del ganado vacuno, del ovino o del caprino, son antigénicamente similares. Contra el VDNC

se han empleado como vacunas vivas cepas atenuadas de origen bovino y cepas derivadas de las ovejas y las cabras.

## A. INTRODUCCIÓN

La dermatitis nodular contagiosa (DNC) se detectó por primera vez en Zambia en 1928, se extendió a Botswana en 1943 (Haig, 1957), y el mismo año a Sudáfrica, donde infectó a más de ocho millones de cabezas de ganado causando importantes pérdidas económicas. En 1957 alcanzó a Kenia, al mismo tiempo que un brote de viruela ovina (Weiss, 1968). En 1970, la DNC se extendió hacia el norte por Sudán, y en 1974 se extendió al oeste alcanzando Nigeria, siendo descrita en Mauritania, Mali, Ghana y Liberia en 1977. Otra epizootia de DNC afectó entre 1981 y 1986 a Tanzania, Kenia, Zimbabue, Somalia y Camerún, con un nivel de mortalidad del 20% en el ganado infectado. La presencia de la DNC en el norte del desierto del Sáhara y fuera del continente africano se confirmó por primera vez en Egipto e Israel entre 1988 y 1989, y se notificó de nuevo en 2006 (Brenner *et al.*, 2006). A lo largo de la última década, se han notificado casos de DNC en regiones de Oriente Medio, Europa y Asia (para conocer los datos actualizados, consúltese la interfaz WAHIS de la OMSA<sup>1</sup>). Los brotes de dermatitis nodular contagiosa tienden a ser esporádicos, y a depender de los desplazamientos de los animales, de su estado inmunitario y de los patrones de vientos y lluvias que afecten a las poblaciones de vectores. El principal método de transmisión se supone que es mecánico por distintos vectores artrópodos (Tuppurainen *et al.*, 2015).

El virus de la dermatitis nodular contagiosa (VDNC) pertenece a la familia *Poxviridae*, subfamilia *Chordopoxvirinae*, género *Capripoxvirus*. Al igual que otros poxvirus, el VDNC se replica en el citoplasma de una célula infectada, constituyendo diversos puntos de replicación vírica perinucleares. El virión de la DNC es grande y tiene forma de ladrillo, y mide 293-299 nm (de largo) y 262-273 nm (de ancho). La estructura del genoma del VDNC también es similar a la de otros poxvirus; consta de ADN lineal bicatenario, tiene un 25% de GC, aproximadamente 150.000 pb de longitud y codifica alrededor de 156 marcos de lectura abiertos (ORF). En cada extremo del genoma lineal se encuentra una secuencia de repetición terminal invertida de 2200-2300 pb. Los extremos lineales del genoma se unen con un bucle de horquilla. La región central del genoma del VDNC contiene ORF que se predice que codifican proteínas requeridas para la replicación y morfogénesis del virus y que muestran un alto grado de similitud con los genomas de otros poxvirus de mamíferos. Los ORF de las regiones externas del genoma del VDNC tienen menor similitud y probablemente codifican proteínas involucradas en la virulencia vírica y determinantes del rango de hospedadores.

El análisis filogenético muestra que la mayoría de las cepas del VDNC se agrupan en dos clústeres monofiléticos (clúster 1.1 y 1.2) (Biswas *et al.*, 2020; Van Schalkwyk *et al.*, 2021). El clúster 1.1 consiste en cepas vacunales de VDNC Neethling que se basan en la cepa vacunal VDNC /Neethling/LW-1959 (Kara *et al.*, 2003; Van Rooyen *et al.*, 1959; van Schalkwyk *et al.*, 2020) y cepas históricas de tipo salvaje de Sudáfrica. El clúster 1.2 está formado por cepas de tipo salvaje del sur de África, Kenia, el hemisferio norte y la vacuna comercial KSGP O-240 de Kenia. Además de estos dos clústeres, recientemente se han aislado cepas recombinantes del VDNC a partir de casos clínicos de DNC en condiciones de campo en Rusia y Asia central (Flannery *et al.*, 2021; Sprygin *et al.*, 2018; 2020; Wang *et al.*, 2021). Estos virus recombinantes muestran patrones únicos de alelos de genes accesorios, que consisten en secciones tanto de cepas de tipo salvaje como de cepas "vacunales" del VDNC.

La gravedad de los síntomas de la DNC es muy variable y depende de varios factores, como la cepa del virus y la edad, el estado inmunitario y la raza del hospedador. Por lo general, *Bos taurus* es más susceptible a la enfermedad clínica que *Bos indicus*; también se ha descrito que el búfalo asiático (*Bubalus spp.*) es susceptible. Dentro de *Bos taurus*, las razas de las Islas del Canal, de piel fina, desarrollan una enfermedad más grave, siendo los terneros lactantes los que parecen presentar un mayor riesgo. No obstante, incluso dentro de grupos de ganado de la misma raza mantenidos juntos en las mismas condiciones, existe una gran variación de los signos que presentan, que van de una infección subclínica a la muerte (Carn y Kitching, 1995). Puede darse el caso de imposibilidad de infección de un grupo entero por el virus, lo cual probablemente depende de la virulencia de la cepa vírica, del estado inmunitario del hospedador, del genotipo del hospedador y de la prevalencia del vector.

No se ha descrito el período de incubación en condiciones de campo, pero, después de una inoculación experimental, es de 6 o 9 días hasta la aparición de la fiebre. En animales con una infección aguda, se presenta una fiebre inicial que puede superar los 41°C y persistir durante una semana. Todos los ganglios linfáticos superficiales presentan aumento de tamaño. En el ganado lechero en lactación, se produce una considerable reducción de la producción de leche. Aparecen lesiones por todo el cuerpo, en concreto por la cabeza, cuello, ubres, escroto, vulva

1 [Sistema Mundial de Información Sanitaria - OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal \(woah.org/\)](https://www.woah.org/)

y periné entre 7 y 19 días después de la inoculación del virus (Coetzer, 2004). Las lesiones integumentarias características son pápulas y nódulos múltiples, entre circunscritos y confluyentes, de 0,5-5 cm de diámetro, duros y de superficie plana. Los nódulos afectan la dermis y la epidermis, y pueden alcanzar el tejido subcutáneo y en ocasiones el músculo estriado adyacente. El interior de estos nódulos es de un color gris cremoso a blanco, e inicialmente pueden exudar suero, pero a lo largo de las 2 semanas siguientes puede aparecer una zona central o secuestro de forma cónica que consiste en un tapón necrótico (“sit-fast”) dentro del nódulo. Las lesiones histológicas agudas consisten en alteraciones vacuolares epidérmicas con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos y vasculitis dérmica. Los cuerpos de inclusión son numerosos, intracitoplasmáticos, eosinofílicos, homogéneos a granulares en ocasiones y pueden tener lugar en células endoteliales, fibroblastos, macrófagos, pericitos y queratinocitos. Las lesiones dérmicas consisten en vasculitis con necrosis fibrinoide, edema, trombosis, linfangitis, separación dérmica-epidérmica e infiltrado inflamatorio mixto. Las lesiones crónicas se caracterizan por un tejido infartado con un centro necrótico secuestrado, a menudo ribeteado por tejido de granulación que es desplazado progresivamente por fibrosis madura. En el momento en que aparecen los nódulos, la secreción ocular y la rinorrea se vuelven mucopurulentas, y puede aparecer queratitis. También pueden aparecer nódulos en las mucosas de la boca y del tracto digestivo, en concreto en el abomaso y en la tráquea y los pulmones, lo cual da lugar a neumonía primaria y secundaria. Los nódulos de las mucosas ocular, nasal, oral, rectal, mamaria y genital se ulceran rápidamente, y para entonces todas las secreciones, la ocular y la nasal, así como la saliva, contienen el virus de la DNC. Las patas pueden presentar edema y el animal no tolerará el movimiento. Las vacas gestantes pueden abortar, y existe un informe de transmisión intrauterina (Roubya y Aboulsoudb, 2016). Los toros pueden quedar infértiles de manera temporal o irreversible y el virus puede excretarse en el semen durante largos periodos de tiempo (Irons *et al.*, 2005). La recuperación del animal tras una infección grave es lenta; el animal queda caquéctico, puede sufrir neumonía y mastitis, y las obstrucciones necróticas de la piel, que pueden haber sufrido la invasión de moscas, se desprenden dejando profundos agujeros (Prozesky y Barnard, 1982).

El principal diagnóstico diferencial es la pseudo-DNC, causada por el herpesvirus bovino tipo 2 (HVBo-2). Suele tratarse de un trastorno clínico más leve, que se caracteriza por unos nódulos superficiales que se parecen solo al estadio inicial de la DNC. Los cuerpos de inclusión intranucleares y los sincitios víricos son características histopatológicas de la infección por el HVBo-2 que no se observan en la DNC. Otros diagnósticos diferenciales (de las lesiones integumentarias) son los siguientes: dermatofitosis, dermatofitosis, muermo bovino, fotosensibilización, actinomicosis, actinobacilosis, urticaria, picaduras de insectos, besnoitosis, nocardiasis, demodicosis, oncocerciasis, pseudo-viruela bovina y viruela bovina. Los diagnósticos diferenciales de las lesiones mucosas son los siguientes: fiebre aftosa, lengua azul, enfermedad de las mucosas, fiebre catarral maligna, rinotraqueítis infecciosa bovina y estomatitis papular bovina.

El virus de la DNC no es transmisible al ser humano. Sin embargo, todas las manipulaciones de laboratorio deben llevarse a cabo a un nivel de contención adecuado, que vendrá determinado por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4. *Bioseguridad y bioprotección: Normas para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*).

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

*Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la dermatitis nodular contagiosa y su finalidad*

Método	Finalidad					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
<b>Detección del agente</b>						
Aislamiento del virus	+	++	+	+++	+	-
PCR	++	+++	++	+++	+	-
Microscopía electrónica de transmisión	-	-	-	+	-	-

Método	Finalidad					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
VN	++	++	++	++	++	++
IFAT	+	+	+	+	+	+
ELISA	++	++	++	++	++	++

Clave: +++ = método recomendado para esta finalidad; ++ = método recomendado, pero tiene limitaciones; + = adecuado en muy pocas circunstancias; – = no adecuado para esta finalidad.  
 PCR = reacción en cadena de la polimerasa; VN = prueba de neutralización del virus;  
 IFAT = inmunofluorescencia indirecta; ELISA = enzimoimmunoanálisis.

## 1. Detección del agente

### 1.1. Obtención, envío y preparación de las muestras

El material para el aislamiento del virus y la detección del antígeno debe obtenerse de los nódulos de la piel en forma de biopsia o examen post-mortem. Las muestras para el aislamiento del virus se deben obtener preferiblemente en un plazo de una semana tras la aparición de los signos clínicos, antes de que se desarrollen anticuerpos neutralizantes (Davies, 1991; Davies *et al.*, 1971), no obstante, el virus se puede aislar de nódulos cutáneos durante al menos 3–4 semanas a partir de ese momento. Pueden obtenerse muestras para la detección genómica utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional o en tiempo real aunque los anticuerpos neutralizantes ya estén presentes. Tras la primera aparición de las lesiones cutáneas, puede aislarse el virus hasta transcurridos 35 días y el ácido nucleico del virus puede detectarse por la PCR hasta transcurridos 3 meses (Tuppurainen *et al.*, 2005; Weiss, 1968). También se puede usar para aislar el virus la capa leucocitaria de sangre mantenida en heparina o EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) durante la fase virémica de la DNC (antes de la generalización de las lesiones o dentro de los 4 días siguientes a la generalización).

Las muestras de sangre con anticoagulante para el aislamiento del virus a partir de la capa leucocitaria deben colocarse inmediatamente en hielo después de un mezclado suave y procesarse lo antes posible. En la práctica, las muestras pueden mantenerse a 4°C hasta 2 días antes de su manipulación posterior, pero no deben congelarse ni mantenerse a temperatura ambiente. Los tejidos para el aislamiento del virus y la detección de antígeno deben mantenerse a 4°C, en hielo o a –20°C. Si es necesario transportar las muestras a grandes distancias sin refrigeración, el medio debe contener glicerol al 10%; las muestras deben ser de un tamaño suficiente, por ejemplo, 1/10 (g/ml), como para que el medio no llegue a la parte central de la biopsia, que debe usarse para el aislamiento de virus.

Las muestras para histología deben incluir la lesión y el tejido de la zona circundante (no lesional), tener un tamaño máximo de 2 cm<sup>3</sup> y colocarse inmediatamente después de su recogida en un volumen diez veces superior al de la muestra de formaldehído tamponado neutro al 10%. Los tejidos en formol no tienen requisitos especiales de transporte con respecto a los biorriesgos. El material para histología debe prepararse empleando técnicas estándar y teñirse con hematoxilina y eosina (H/E) (Burdin, 1959).

El material de las lesiones para el aislamiento del virus y la detección de antígeno se trocea usando pinzas y hojas de bisturí estériles y luego se macera en un molino con bolas de acero estériles, o bien se tritura manualmente en un mortero estéril con arena estéril y un volumen igual de solución salina tamponada con fosfato (PBS) o medio de Eagle modificado sin suero también estéril que contenga penicilina sódica (1.000 unidades internacionales [UI]/ml, sulfato de estreptomina (1 mg/ml), micostatina (100 UI/ml) o fungizona (anfotericina, 2,5 µg/ml) y neomicina (200 UI/ml). La suspensión se congela y se descongela tres veces y luego se clarifica parcialmente usando una centrifuga de mesa a 600 *g* durante 10 minutos.

En los casos en que sea esperable contaminación bacteriana de la muestra (como cuando el virus se aísla de muestras de piel), el sobrenadante se puede filtrar por un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro tras el paso de la centrifugación. Las capas leucocitarias se preparan a partir de sangre no coagulada por centrifugación a 600 *g* durante 15 minutos, y la capa se extrae con cuidado usando una pipeta Pasteur estéril y se introduce en 5 ml de agua fría doblemente destilada. Después de 30 segundos se añaden 5 ml de un medio de crecimiento frío a una concentración doble y se mezcla. La mezcla se centrifuga a 600 *g* durante 15 minutos, se elimina el sobrenadante y el precipitado celular se suspende en 5 ml de medio de crecimiento, como medio Eagle modificado de Glasgow (GMEM). Después se centrifuga a 600 *g* otros 15 minutos, y el precipitado resultante se resuspende en 5 ml de GMEM fresco. Como alternativa, la capa leucocitaria se puede separar de una muestra heparinizada utilizando un gradiente de Ficoll.

## 1.2. Aislamiento del virus en cultivo celular

El virus de la DNC crecerá en cultivos de tejidos de origen bovino, ovino o caprino. A menudo se utilizan células MDBK (de riñón bovino Madin-Darby), puesto que permiten un buen crecimiento del virus y están bien caracterizadas (Fay *et al.*, 2020). Las células primarias, como las de testículos de cordero (LT), también permiten el crecimiento del virus, pero debe asegurarse que no estén contaminadas por virus como el de la diarrea vírica bovina. La muestra se prepara como antes, es decir, se inocula 1 ml de sobrenadante clarificado o de la capa leucocitaria en una monocapa confluyente de un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> a 37°C y se permite la adsorción durante 1 hora. A continuación se lava el cultivo con PBS caliente y se recubre con 10 ml de un medio adecuado, como GMEM, que contenga antibióticos y un 2% de suero fetal bovino. Si se dispone de ellos, también se infectan tubos de cultivo de tejidos que contengan células apropiadas y un cubreobjetos o portaobjetos para cultivo de tejidos.

Se examinan diariamente los frascos/tubos de cultivo tisular durante 7-14 días para comprobar si presentan efecto citopático (ECP). Las células infectadas desarrollan un ECP característico que consiste en la retracción de la membrana celular de las células circundantes, y finalmente en un redondeamiento de las células y la marginación de la cromatina nuclear. Al principio sólo se ven pequeñas áreas de ECP, a veces tan sólo a los 2 días después de la infección; en los siguientes 4 o 6 días las áreas se extienden hasta abarcar toda la monocapa celular. Si no aparece ECP después de 14 días, el cultivo se debe congelar y descongelar tres veces y, una vez clarificado el sobrenadante, se inocula en una monocapa celular fresca. Al primer signo de ECP en los frascos, o antes si se usan varios cubres infectados, se toma un cubre, se fija con acetona y se tiñe con H/E. La presencia de cuerpos de inclusión citoplasmáticos que sean eosinófilos, variables en tamaño pero que pueden ser como la mitad del núcleo y rodeados por un halo claro, constituye un diagnóstico de infección por poxvirus. La PCR puede emplearse como alternativa a la H&E para la confirmación del diagnóstico. El ECP se puede evitar o retrasar incluyendo en el medio un antisuero específico anti-VDNC. Por el contrario, el herpesvirus o el virus pseudo-DNC producen cuerpos de inclusión intranucleares de Cowdry tipo A. También forma sincitios. Se ha evaluado una línea celular de testículo ovino (OA3.Ts) (Babiuk *et al.*, 2007), pero se ha observado que está contaminada por pestivirus no citopáticos y debe utilizarse con precaución.

## 1.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR en gel convencional descrita a continuación es un método sencillo, rápido y sensible para la detección del genoma del capripoxvirus en muestras de sangre en EDTA, semen o cultivo celular (Tuppurainen *et al.*, 2005).

### 1.3.1. Procedimiento analítico

El método de extracción descrito a continuación puede sustituirse por kits comerciales de extracción de ADN.

- i) Se congelan y descongelan 200 µl de sangre en EDTA, semen o sobrenadante de cultivo tisular y se suspende en 100 µl de tampón de lisis que contenga tiocianato de guanidina 5 M, cloruro de potasio 50 mM, Tris/HCl 10 mM (pH 8); y 0,5 ml de Tween 20.
- ii) Se cortan en trozos finos las muestras de piel y de otros tejidos con una hoja de bisturí y unas tijeras estériles. Se trituran en un mortero con mano. Se suspenden las muestras tisulares en 800 µl del tampón de lisis anteriormente mencionado.

- iii) Se añaden 2 µl de proteinasa K (20 mg/ml) a las muestras de sangre y 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml) a las muestras de tejido. Se incuban en estufa a 56°C durante 2 horas o durante toda la noche calentándolas después a 100°C durante 10 minutos. Se añade fenol-cloroformo-isoamilalcohol (25:24:1 [v/v]) a las muestras a una proporción de 1:1. Se agitan en un vórtex y se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se centrifugan las muestras a 16.060 *g* durante 15 minutos a 4°C. Se recoge con cuidado la fase acuosa superior (hasta 200 µl) y se transfiere a un tubo limpio de 2,0 ml. Se añaden dos volúmenes de etanol helado (100%) y 1/10 de acetato de sodio 3 M (pH 5,3). Se ponen las muestras a -20°C durante 1 hora. Se centrifugan de nuevo a 16.060 *g* durante 15 minutos a 4°C y se desecha el sobrenadante. Se lavan los precipitados con etanol frío al 70% (100 µl) y se centrifugan a 16.060 *g* durante 1 minuto a 4°C. Se desecha el sobrenadante y se secan bien los precipitados. Se suspenden los precipitados en 30 µl de agua libre de nucleadas y se guardan inmediatamente a -20°C (Tuppurainen *et al.*, 2005).
- iv) Los cebadores para esta PCR se desarrollaron a partir del gen que codifica la proteína que permite la unión del virus. El tamaño del amplicón esperable es de 192 pb (Ireland y Binopal, 1998). Los cebadores tienen las siguientes secuencias génicas:
- Cebador directo: 5'-TCC-GAG-CTC-TTT-CCT-GAT-TTT-TCT-TAC-TAT-3'
- Cebador inverso : 5'- TAT- GGT-ACC-TAA-ATT-ATA-TAC-GTA-AAT-AAC-3'.
- v) La amplificación del ADN se lleva a cabo en un volumen final de 50 µl que contiene: 5 µl de tampón 10× par PCR, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 µl de dNTP 10 mM, 1 µl de cebador directo, 1 µl de cebador inverso, 1 µl de ADN molde, 0,5 µl de ADN polimerasa Taq y 39 µl de agua libre de nucleasas. Puede variar el volumen de ADN molde, y el volumen de agua libre de nucleasas debe ajustarse a un volumen final de 50 µl.
- vi) Se someten las muestras a un termociclador del siguiente modo: 2 minutos a 95°C; después: 45 segundos a 95°C, 50 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C (34 ciclos); 2 minutos a 72°C y se mantienen a 4°C hasta el análisis.
- vii) Se mezclan 10 µl de cada muestra con una solución de tinción y se cargan en gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE (tampón Tris/acetato que contenga EDTA). Se llena una línea paralela con una escala marcadora de ADN de 100 pb. Se separan los productos mediante electroforesis utilizando con unos 8–10 V/cm durante 40–60 minutos y se visualizan con una tinción para ADN adecuada y un transiluminador.

Se han descrito PCR en tiempo real cuantitativas que se ha observado que son más rápidas y tienen mayor sensibilidad que las PCR convencionales (Balinsky *et al.*, 2008; Bowden *et al.*, 2008). Se ha publicado una PCR en tiempo real que diferencia entre el VDNC, el virus de la viruela ovina y el virus de la viruela caprina (Lamien *et al.*, 2011).

Se han diseñado ensayos cuantitativos de PCR en tiempo real para diferenciar entre las cepas de VDNC basadas en Neethling, que a menudo se utilizan para la vacunación, y las cepas de VDNC de tipo salvaje del clúster 1.2 (Agianniotaki *et al.*, 2017; Pestova *et al.*, 2018; Vidanovic *et al.*, 2016). Estos ensayos “DIVA” (DIVA: diferenciación entre animales infectados y vacunados) permiten, por ejemplo, diferenciar la “respuesta a Neethling” causada por la vacunación con una cepa vacunal del VDNC Neethling, de la enfermedad causada por la infección por un virus de tipo salvaje del clúster 1.2. Sin embargo, estas PCR para DIVA no pueden distinguir entre una cepa vacunal de VDNC Neethling y las nuevas cepas recombinantes de VDNC aisladas recientemente de brotes de la enfermedad en Asia (Byadovskaya *et al.*, 2021; Flannery *et al.*, 2021). Estos ensayos DIVA tampoco son capaces de discriminar entre las cepas vacunales de VDNC Neethling y los virus de tipo salvaje recientemente caracterizados (históricos) de Sudáfrica pertenecientes al clúster 1.1 (Van Schalkwyk *et al.*, 2020; 2021). Por consiguiente, en las regiones en las que circulan cepas recombinantes (actualmente Asia y posiblemente otros lugares) o cepas de tipo salvaje del clúster 1.1 (actualmente Sudáfrica y posiblemente otros lugares), estos ensayos DIVA no son adecuados para distinguir los virus vacunales de los de tipo salvaje. Por lo tanto, para superar estas limitaciones, se recomienda la secuenciación del genoma completo.

## 1.4. Microscopía electrónica de transmisión

El virión de poxvirus característico se puede visualizar con una técnica de preparación de tinción negativa seguida del examen con un microscopio electrónico. Existen muchos protocolos de tinción negativa distintos, y a continuación se describe uno a modo de ejemplo.

### 1.4.1. Procedimiento analítico

Antes de la centrifugación, el material de la suspensión de la biopsia original se prepara para su examen en el microscopio electrónico de transmisión colocando una rejilla hexagonal de malla 400 para microscopía electrónica, con sustrato de pioloforma-carbón activado por descarga de brillo en vapor de pentilamida, sobre una gota de la suspensión colocada sobre parafina o una placa de cera. Después de 1 minuto, la rejilla se transfiere a una gota de tampón Tris/EDTA, pH 7,8, durante 20 segundos y luego a una gota de ácido fosfotúngstico al 1%, pH 7,2, durante 10 segundos. La rejilla se deseca con papel de filtro, se seca al aire y se coloca en el microscopio electrónico. El virión del capripoxvirus tiene forma de ladrillo, está cubierto por elementos tubulares cortos y mide aproximadamente 290 × 270 nm. Una membrana que procede de la célula hospedadora puede rodear algunos de los viriones, y se deben examinar tantos como sea posible para confirmar su aparición (Kitching y Smale, 1986).

Los viriones de los capripoxvirus no se diferencian de los de los ortopoxvirus, pero, aparte del virus de la vaccinia y del virus de la viruela, ambos son infrecuentes en el ganado y no causantes de infección generalizada, y por lo que se sabe, ningún otro ortopoxvirus causa lesiones en el ganado bovino. No obstante, el virus de la vaccinia puede causar una infección generalizada en terneros de corta edad inmunocomprometidos. Por el contrario, los ortopoxvirus son una causa corriente de enfermedades cutáneas en el búfalo doméstico originando la viruela del búfalo, una enfermedad que normalmente se manifiesta con pústulas en los pezones, aunque también puede causar lesiones cutáneas en otras zonas, como el periné, la cara medial de los muslos y la cabeza. Los ortopoxvirus que causan la viruela del búfalo no pueden distinguirse fácilmente de los capripoxvirus por microscopía electrónica. Los viriones de los parapoxvirus que producen la estomatitis papular bovina y la seudoviruela son más pequeños, de tamaño oval y cada uno está cubierto por un único elemento tubular continuo que parece formar estriaciones sobre el virión. Los viriones de capripoxvirus también se diferencian claramente del herpesvirus que provoca la pseudo-DNC (también denominado virus de la mamilitis herpética bovina o virus de Allerton).

## 1.5. Pruebas de inmunofluorescencia

El antígeno del capripoxvirus puede identificarse también en los cubres infectados o en los portas de cultivo de tejidos usando pruebas de inmunofluorescencia. Los cubres o los portas deben estar lavados y secarse al aire, y fijarse en acetona fría durante 10 minutos. El método indirecto, en el que se utilizan sueros de ganado inmune, presenta mucho color de fondo y reacciones no específicas. Sin embargo, se puede preparar un conjugado directo a partir de sueros de ganado bovino convaleciente (o de ovejas o cabras convalecientes del capripoxvirus) o a partir de conejos hiperinmunizados con capripoxvirus purificado. Se debe incluir un cultivo de tejidos no infectado como control negativo ya que las reacciones cruzadas debidas a la presencia de anticuerpos contra componentes celulares pueden causar problemas (una preabsorción de estos a partir del suero inmune ayuda a resolver este problema)

## 1.6. Inmunohistoquímica

Se ha descrito una técnica de inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal F80G5 específico del ORF 057 de capripoxvirus para la detección de antígenos del VDNC en la piel de ganado bovino infectado de forma experimental (Babiuk *et al.*, 2008).

## 1.7. Amplificación isotérmica del genoma

Se ha observado que las pruebas moleculares en las que se emplea la amplificación isotérmica mediada por bucle para detectar genomas de capripoxvirus aportan una sensibilidad y una Especificidad similares a las de la PCR en tiempo real, y que el método es más sencillo y barato (Das *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2013). Omoga *et al.* (2016) ha descrito la validación en condiciones de campo del método de Das *et al.*

## 2. Pruebas serológicas

Todos los virus del género *Capripoxvirus* comparten un antígeno común importante para los anticuerpos neutralizantes y por tanto no es posible diferenciar las cepas de capripoxvirus del ganado bovino, las ovejas y las cabras utilizando técnicas serológicas.

### 2.1. Neutralización vírica

Un suero problema se puede titular frente a una concentración constante de capripoxvirus (100 DICT<sub>50</sub> [dosis infectiva 50% en cultivo de tejidos]) o bien una cepa estándar de virus se puede titular frente a una dilución constante del suero problema para calcular el índice de neutralización. Debido a variaciones en la sensibilidad del cultivo de tejidos a los capripoxvirus y la consiguiente dificultad de asegurar una siembra exacta y repetible 100 DICT<sub>50</sub>/pocillo, el método preferido en la mayoría de laboratorios es el índice de neutralización, aunque ello requiere un mayor volumen de sueros problema. El método se describe usando una placa de microtitulación de grado cultivo tisular con 96 pocillos de fondo plano, pero puede realizarse igualmente en tubos de cultivo de tejidos con los cambios de volumen adecuados, aunque resulta más difícil determinar en tubos los resultados de punto final.

#### 2.1.1. Procedimiento analítico

- i) Los sueros problema, incluyendo un control positivo y un control negativo, se diluyen al 1/5 con tampón Eagle/HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina, ácido N-2-etanosulfónico) y se inactivan a 56°C durante 30 minutos
- ii) A continuación, se añaden 50 µl del primer suero inactivado a los pocillos de las columnas 1 y 2, de las filas A hasta la H, en la placa de microtitulación. El segundo suero se coloca en las columnas 3 y 4, el tercero en las columnas 5 y 6, el control de suero positivo en las columnas 7 y 8, el control de suero negativo en las columnas 9 y 10, y se añaden 50 µl de tampón Eagle/HEPES sin suero en las columnas 11 y 12 y a todos los pocillos de la fila H.
- iii) Una cepa de referencia de capripoxvirus, normalmente una cepa vacunal que se sepa que crece bien en cultivo de tejidos, y con un título superior a 6 log<sub>10</sub> DICT<sub>50</sub> por ml, se diluye con Eagle/HEPES en pequeños recipientes para dar una dilución seriada de 5,0; 4,0; 3,5; 3,0; 2,5; 2,0; 1,5 log<sub>10</sub> DICT<sub>50</sub> por ml (equivalente a 3,7; 2,7; 2,2; 1,7; 1,2; 0,7; 0,2 log<sub>10</sub> DICT<sub>50</sub> por 50 µl).
- iv) Comenzando por la fila G y la preparación de virus más diluida, se añaden 50 µl de virus a cada pocillo de esa fila. Esto se repite con cada dilución de virus, colocando la dilución de virus de titulación mayor en la fila A
- v) Las placas se cubren e incuban 1 hora a 37°C.
- vi) A partir de monocapas cultivadas con anterioridad se prepara una suspensión celular adecuada (como por ejemplo, de células MDBK) de 10<sup>5</sup> células/ml en medio Eagle con antibióticos y un 2% de suero fetal bovino. Después de incubar las placas de microtitulación, se añaden 100 µl de la suspensión celular a todos los pocillos excepto a los pocillos H11 y H12, que sirven como control para el medio. El resto de los pocillos de la fila H son los controles de las células y del suero
- vii) Las placas de microtitulación se cubren e incuban a 37°C durante 9 días.
- viii) Utilizando un microscopio invertido, las monocapas se examinan diariamente a partir del día 4 para comprobar si presentan ECP. No debe apreciarse ECP en las células de la fila H. Utilizando la cepa vacunal 0240 KSGP de capripoxvirus; a título de ejemplo, la lectura final se hace el día 9, y el título del virus en cada titulación por duplicado se calcula utilizando el método de Kärber. Si se deja más tiempo, aparece de modo invariable un aumento de virus en cual el virus que se neutralizó primero parece disociarse del anticuerpo.
- ix) *Interpretación de los resultados:* El índice de neutralización es el logaritmo del título de la diferencia entre el título del virus en el suero negativo y en el suero problema. Un índice ≥ 1,5 se considera positivo. La prueba se puede hacer más sensible si se examina el suero del mismo animal antes y después de la infección. Debido a que la inmunidad a los capripoxvirus está predominantemente mediada por células, un resultado negativo, en especial después de una vacunación en la que la respuesta puede ser baja, no implica que el animal del que deriva el suero no esté protegido

Pueden detectarse anticuerpos frente al capripoxvirus desde 1 a 2 días después de la aparición de los signos clínicos. Permanecen detectables durante unos 7 meses.

## 2.2. Enzimoimmunoanálisis

Para la detección de anticuerpos contra capripoxvirus se utiliza mucho el enzimoimmunoanálisis (ELISA) y está a la venta en forma de kit comercial (Milovanovic *et al.*, 2019; Samojlovic *et al.*, 2019).

## 2.3. Prueba de inmunofluorescencia indirecta

Para la prueba de inmunofluorescencia indirecta se puede usar un cultivo de tejidos infectado por capripoxvirus cultivado sobre cubres o sobre portas de los utilizados en microscopía. Se debe incluir en la prueba un cultivo control de tejidos no infectado, así como un suero control positivo y uno negativo. Los cultivos infectados y el cultivo control se fijan en acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos y se mantienen a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las diluciones de los sueros problema se realizan en PBS, empezando a 1/20 o 1/40, y los positivos se identifican usando un anticuerpo anti gamma-globulina bovina conjugado a isotiocianato de fluoresceína. El título de anticuerpos puede ser superior a 1/1.000 después de la infección. Los sueros pueden ser probados a 1/50 y 1/500. Pueden existir reacciones cruzadas con el virus orf (virus de la dermatitis pustular contagiosa de la oveja), el de la estomatitis papular bovina y quizás con otros poxvirus.

## 2.4. Análisis mediante inmunoelectrotransferencia

La inmunoelectrotransferencia realizada con sueros problema frente a lisados de células infectadas por capripoxvirus constituye un sistema sensible y específico para detectar anticuerpos contra las proteínas estructurales del capripoxvirus, aunque la prueba resulta costosa y difícil de realizar.

Las células LT infectadas por capripoxvirus deben recogerse cuando se observa un 90% de ECP, se congelan y descongelan tres veces, y los restos celulares se sedimentan por centrifugación. El sobrenadante se decanta, y las proteínas se preparan para su separación por SDS/PAGE (dodecil sulfato sódico/electroforesis en gel de poliacrilamida). Se recomienda un sistema vertical de gel discontinuo, usando gel concentrador con acrilamida al 5% en Tris (125 mM), pH 6,8 y SDS (0,1%), y gel de resolución con acrilamida (10–12,5%) en Tris (560 mM), pH 8,7, y SDS (0,1%), empleando como tampón de desarrollo un tampón de glicina que contenga Tris (250 mM), glicina (2M), y SDS (0,1%). Las muestras de sobrenadante se preparan por ebullición durante 5 minutos con un tampón de lisis apropiado antes de su carga en la electroforesis. Como alternativa, el antígeno derivado del cultivo de tejidos puede ser reemplazado por virus purificados o por antígenos recombinantes.

Deben analizarse en paralelo con las proteínas de la muestra una serie de marcadores de peso molecular. Las proteínas separadas en el gel SDS/PAGE se transfieren mediante electroforesis a una membrana de nitrocelulosa (NCM). Después de la transferencia, la NCM se lava exhaustivamente con PBS y se bloquea con un 3% de seroalbúmina bovina (BSA) en PBS, o con un 5% de leche en polvo desnatada en PBS, en un agitador rotatorio a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. A continuación, la NCM se puede separar en tiras empleando un aparato comercial para poder analizar simultáneamente múltiples muestras de suero, o se puede cortar en tiras y cada una de ellas se incuban luego por separado. La NCM se lava cuidadosamente con cinco cambios de PBS durante 5 minutos en un agitador rotatorio y luego se incuba a temperatura ambiente durante 1,5 horas en un agitador con el suero apropiado a una dilución 1/50 en tampón de bloqueo (3% de BSA y 0,05% de Tween 20 en PBS; o 5% de leche en polvo desnatada y 0,05% de Tween 20 en PBS). La membrana se lava de nuevo exhaustivamente y se incuba (en tampón de bloqueo) con inmunoglobulinas anti-inmunoglobulinas de la especie conjugadas con peroxidasa de rábano a una dilución determinada por la titulación. Después de una incubación posterior a temperatura ambiente durante 1,5 horas, se lava la membrana y se añade una solución de tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (10 mg en 50 ml de Tris/HCl 50 mM, pH 7,5, y 20  $\mu\text{l}$  de peróxido de hidrógeno al 30% [v/v]). A continuación, se lleva a cabo una incubación de aproximadamente 3–7 minutos a temperatura ambiente en un agitador, con observación constante, y la reacción se detiene lavando la NCM en PBS antes de que aparezca un excesivo color de fondo. En cada ocasión se debería usar un suero control negativo y uno positivo.

Las muestras que se consideran positivas en la prueba y el control positivo producirán un modelo de bandas que corresponde a la reacción frente a las proteínas de peso molecular 67, 32, 26, 19 y 17 kDa –

que son las principales proteínas estructurales del capripoxvirus – mientras que las muestras de suero negativo no reaccionarán con todas estas proteínas. Un suero hiperinmune preparado contra parapoxvirus (virus de la estomatitis papular bovina o de la seudoviruela) reaccionará con algunas de las proteínas del capripoxvirus, pero no con la proteína de 32 kDa que es específica del capripoxvirus.

## **C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS [ESTA SECCIÓN SE REVISARÁ EN EL CICLO DE REVISIÓN 2023/2024]**

### **1. Antecedentes: fundamentos y uso previsto del producto**

Se han usado cuatro cepas vivas atenuadas de capripoxvirus como vacunas para el control de la DNC (Brenner et al., 2006; Capstick y Coakley, 1961; Carn, 1993). Los capripoxvirus presentan reacción cruzada dentro de su género. Por ello, es posible proteger al ganado contra la DNC utilizando cepas de capripoxvirus procedentes de ovejas o cabras (Coakley y Capstick, 1961). Sin embargo, se recomienda realizar pruebas controladas antes de introducir una cepa vacunal no utilizada normalmente en el ganado, usando las razas más susceptibles. La duración de la protección proporcionada por la vacunación contra el VDNC se desconoce.

Las cepas de la vacuna contra capripoxvirus pueden producir una fuerte reacción local en el punto de inoculación en razas de *Bos taurus* (Davies, 1991), lo cual algunos ganaderos consideran inaceptable. Esto ha desalentado el uso de las vacunas, aunque las consecuencias de un brote de DNC siempre son más graves. Tras un debate con las partes interesadas, deberá valorarse la relación riesgo-beneficio de la vacunación.

### **2. Resumen de la producción y requisitos mínimos para las vacunas convencionales**

Los requisitos generales establecidos para las instalaciones en la que se producen vacunas y para la documentación y mantenimiento de registros a lo largo de todo el proceso de fabricación se describen en el Capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. La documentación debe incluir procedimientos normalizados de trabajo (PNT) para el método de fabricación y para cada paso de análisis de las células y reactivos utilizados en el proceso, así como para cada lote y para el producto final.

#### **2.1. Características del inóculo**

##### **2.1.1. Características biológicas**

Toda cepa de siembra de capripoxvirus que se utilice para la producción de vacuna debe ir acompañada de registros que describan claramente y con exactitud su origen, aislamiento e historial de pases en cultivos tisulares o en animales. Preferiblemente, las especies y cepas de capripoxvirus se caracterizan empleando PCR o técnicas de secuenciación del ADN.

Debe prepararse una cantidad inóculo primario de virus vacunal, congelarse o desecarse y conservarse a bajas temperaturas, por ejemplo a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y utilizarse para producir un inóculo de trabajo de características constantes para la producción regular de la vacuna.

Ninguna de las cepas de inóculo primario puede ser transmisible, y todas deben permanecer atenuadas tras posteriores pases en cultivo tisular, y proporcionar una protección completa contra el desafío con cepas naturales virulentas durante un mínimo de 1 año. Debe producir una reacción clínica muy leve en ganado bovino cuando se administre por la vía recomendada.

Las pruebas de inocuidad y potencia necesarias se describen en el apartado C.2.2.4 *Pruebas en los lotes de producto final*.

##### **2.1.2. Criterios de calidad (esterilidad, pureza, ausencia de agentes extraños)**

Todo inóculo primario debe analizarse para comprobar su identidad y para demostrar que está libre de virus ajenos, en concreto de pestivirus, como el virus de la enfermedad de la frontera y de la diarrea vírica bovina, y libre de contaminación bacteriana, fúngica y/o por micoplasmas.

Los procedimientos generales para las pruebas de esterilidad/pureza se describen en el Capítulo 1.1.9. *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario.*

## 2.2. Método de fabricación

El método de fabricación debe documentarse como Resumen de la Producción.

### 2.2.1. Procedimiento

Los lotes de vacunas se producen en una línea celular apropiada, como MDBK. El número requerido de viales de virus inóculo se reconstituye con GMEM u otro medio apropiado y se inocula en una monocapa. En los casos de máxima infectividad vírica, las células deben recolectarse después de 4 a 8 días, cuando exhiben un 50 a 70% de ECP, o antes si el ECP es extenso y las células parecen estar listas para desprenderse. Se utilizan técnicas como la sonicación o la congelación-descongelación repetida para liberar el virus intracelular del citoplasma. A continuación, el lisado se puede aclarar para eliminar los restos celulares (por ejemplo, mediante el uso de centrifugación a 600 *g* durante 20 minutos, con retención del sobrenadante). Puede ser necesario un segundo pase del virus para producir suficiente virus para un lote de producción.

Se titula una alícuota de la suspensión del virus para comprobar el título del mismo. A continuación, la suspensión que contiene el virus se mezcla con un protector adecuado, como un volumen igual de hidrolizado de lactoalbúmina al 5% estéril y enfriado y sacarosa al 10% (disuelto en agua bidestilada o solución salina equilibrada adecuada), y se transfiere a botellas numeradas individualmente para la conservación a bajas temperaturas, como  $-80^{\circ}\text{C}$ , o para liofilización. Se debe mantener un registro escrito de todos los procedimientos seguidos en todos los lotes de vacunas.

### 2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

Debe documentarse la especificación y el origen de todos los ingredientes utilizados en el proceso de fabricación, así como la ausencia de agentes extraños: deben comprobarse bacterias, hongos, micoplasmas y virus. El procedimiento analítico se describe en detalle en el Capítulo 1.1.9. El uso de antibióticos debe cumplir los requisitos de la autoridad competente.

### 2.2.3. Control durante el proceso

#### i) Células

Deben mantenerse registros del origen de los stocks de células primarias. Los máximos y mínimos números de pases de las células aplicables durante la producción de vacuna deben indicarse en el resumen de la producción. Se recomienda claramente el uso de una línea celular continua (como MDBK, etc.), a no ser que la cepa vírica solo crezca en células primarias. La ventaja clave de las líneas celulares continuas respecto a las primarias es que hay menor riesgo de introducción de agentes extraños.

#### ii) Suero

El suero utilizado en el medio de cultivo o de mantenimiento debe estar libre de anticuerpos contra el capripoxvirus y libre de contaminación por pestivirus u otros virus, bacterias, micoplasmas u hongos.

#### iii) Medio

Los medios deben ser estériles antes de su uso.

#### iv) Virus

El inóculo de virus y la vacuna final deben valorarse y demostrar el título de liberación mínimo establecido por el fabricante. La dosis de campo mínima recomendada de las vacunas de la cepa sudafricana Neethling (Mathijs *et al.*, 2016) es de  $3,5 \log_{10}\text{DICT}_{50}$ , aunque la dosis protectora mínima es  $2,0 \log_{10}\text{DICT}_{50}$ . El capripoxvirus es muy susceptible a la

inactivación por la luz solar, y se deben tener en cuenta una pérdida de actividad en condiciones de campo.

La dosis de campo recomendada en los bóvidos para la vacuna rumana de viruela ovina es  $2,5 \log_{10}$  dosis infectivas en las ovejas ( $DIO_{50}$ ), y la dosis recomendada para los bóvidos de la cepa adaptada RM65 de la vacuna rumana de la viruela ovina es  $3 \log_{10} DICT_{50}$  (Coakley & Capstick, 1961).

#### 2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

##### i) Esterilidad/pureza

Deben analizarse muestras de la vacuna para comprobar la esterilidad y la pureza. Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario se encuentran en el Capítulo 1.1.9.

##### ii) Inocuidad y eficacia

Las pruebas de eficacia y de inocuidad deben demostrarse mediante estudios de vacunación-desafío estadísticamente válidos utilizando animales de corta edad de razas bovinas lecheras susceptibles al VDNC que sean seronegativos. El número de animales por grupo recomendado aquí puede variar si ello se justifica estadísticamente. Los bovinos se alojan en una unidad animal amplia de alto nivel de contención y se recogen muestras de suero. Se reconstituyen con PBS estéril cinco viales escogidos al azar de la vacuna liofilizada y se mezclan. Se inoculan dos cabezas con 10 veces la dosis de campo recomendada de la vacuna, y ocho cabezas de ganado se inoculan con la dosis de campo recomendada. Las cinco cabezas restantes son los animales control no vacunados. Cada día se realiza una exploración física de los animales y se anotan sus temperaturas rectales. El día 21 después de la inoculación, se toman de nuevo muestras de suero de los animales y se exponen a una cepa virulenta conocida de capripoxvirus. La solución vírica de desafío también debe analizarse para comprobar que esté libre de virus extraños. Se anota la respuesta clínica durante los 14 días siguientes. Los animales del grupo control no vacunado deberían desarrollar los signos clínicos típicos de la DNC, mientras que no debería haber ninguna reacción sistémica ni local en los vacunados, excepto una zona elevada de la piel en el punto de vacunación que debería desaparecer a los 4 días. Se toman de nuevo muestras de suero a los 30 días de la vacunación. Las muestras de suero del día 21 se analizan para detectar la seroconversión respecto a las enfermedades víricas seleccionadas que pudieran haber contaminado la vacuna, y se comparan las muestras de los días 0 y 30 para confirmar la ausencia de anticuerpos frente al pestivirus. Debido a la respuesta variable del ganado a la infección por la DNC, puede que no se observe una enfermedad generalizada en todos los animales control no vacunados, aunque debería presentarse una gran reacción local.

Una vez determinada la eficacia de la cepa en concreto que se esté utilizando para producir la vacuna, en términos de dosis mínima necesaria para producir inmunidad, no será necesario repetir esta determinación en el producto final de cada lote, siempre que se haya verificado el título vírico.

##### iii) Potencia del lote

En el ganado bovino deben realizarse pruebas de potencia de las cepas vacunales de capripoxvirus si no se conoce la dosis mínima inmunizante. Normalmente esto se lleva a cabo comparando el título de un virus virulento de desafío en el costado de los animales vacunados y en el de los animales control. Después de la vacunación, se rasuran los flancos de al menos tres animales y tres controles. Se preparan diluciones logarítmicas decimales del virus de desafío en PBS estéril y se inoculan intradérmicamente seis diluciones (0,1 ml por inóculo) a lo largo del costado; se inoculan cuatro réplicas de cada dilución en la parte baja del costado. Aparecerá una hinchazón edematosa posiblemente en cada uno de los 24 puntos de la inoculación en los animales control, aunque lo preferible es que haya poca o nula reacción en los cuatro puntos de los inóculos más diluidos. Los animales vacunados pueden desarrollar una reacción inicial de hipersensibilidad en las inoculaciones en un plazo de 24 horas, que remiten con prontitud. Pueden aparecer pequeñas áreas de necrosis en el punto de la inoculación del virus de desafío más concentrado. Se calcula el título del virus

de desafío para los animales vacunados y los animales control; una diferencia  $> 2,5 \log_{10}$  en el título logarítmico se considera una evidencia de protección.

## 2.3. Requisitos para la aprobación del registro

### 2.3.1. Requisitos de inocuidad

- i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

La vacuna debe ser inocua para todas las razas bovinas a las que vaya destinada, incluidos animales de corta edad y gestantes. Asimismo, no puede ser transmisible y debe permanecer atenuada tras posteriores pases en cultivo tisular.

Deben llevarse a cabo pruebas de inocuidad en el producto final de cada lote según se describe en el apartado C.2.2.4.

- ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas

La vacuna final seleccionada no debe revertir a la virulencia durante posteriores pases en especies de destino.

- iii) Consideraciones medioambientales

La vacuna atenuada no debe ser capaz de perpetuarse autónomamente en una población bovina. Las cepas del virus de la DNC no suponen un peligro para la salud humana.

### 2.3.2. Requisitos de eficacia

- i) Para la producción animal

La eficacia de la vacuna debe demostrarse en pruebas de vacunación de desafío estadísticamente válidas y en condiciones de laboratorio. Los números de animales por grupo recomendados aquí pueden variar si ello se justifica estadísticamente. Se instalan quince reses en una unidad para grandes animales y de un nivel de contención alto, y se obtienen muestras de suero. Se reconstituyen con PBS estéril cinco viales escogidos al azar de la vacuna liofilizada y se mezclan. Dos animales se inoculan con 10 veces la dosis de campo de la vacuna, ocho, se inoculan con la dosis de campo recomendada, y los cinco restantes se dejan como animales control sin vacunar. Los animales se examinan clínicamente a diario y se registran sus temperaturas rectales. El día 21 tras la vacunación, se vuelven a obtener muestras de suero de los seis animales y estos se exponen a una cepa virulenta conocida de capripoxvirus mediante inoculación intravenosa y por vía intradérmica (la solución de virus de desafío también debe analizarse y debe comprobarse que esté libre de virus extraños). La respuesta clínica se registra durante los 14 días siguientes. Los animales del grupo control no vacunados deberían desarrollar los signos clínicos típicos de la DNC, mientras que los vacunados no deberían presentar reacción local ni sistémica, aparte de una zona de la piel elevada en el punto de vacunación, que debería desaparecer en 4 días. Se vuelven a tomar muestras de suero el día 30 tras la vacunación. Las muestras de suero del día 21 se examinan para comprobar si ha habido seroconversión respecto a las enfermedades víricas seleccionadas que pudieran haber contaminado la vacuna, y se comparan las muestras de los días 0 y 30 para confirmar la ausencia de anticuerpos contra pestivirus. Dada la variabilidad en la respuesta del ganado bovino a la exposición al VDNC, puede que no se observe enfermedad generalizada en todos los animales control no vacunados, aunque deberían presentar una gran reacción local.

Una vez se ha determinado la potencia de la cepa concreta que se está utilizando para la producción de vacuna en cuanto a dosis mínima necesaria para conferir inmunidad, no es necesario repetir esta prueba en el producto final de cada lote, siempre que se haya determinado el título del virus.

- ii) Para el control y la erradicación

La vacunación es la única forma de controlar eficazmente los brotes de dermatitis nodular contagiosa en los países endémicos, y experiencias recientes con la enfermedad en Europa

oriental y en los Balcanes indican que esto también es cierto en el caso de brotes de países no endémicos. Desafortunadamente, actualmente no se dispone de vacunas marcadoras que permitan una estrategia DIVA, aunque hasta cierto punto la PCR se puede utilizar para ciertas vacunas.

En la actualidad se desconoce la duración de la inmunidad generada por cepas vacunales del VDNC.

### 2.3.3. Estabilidad

A todas las vacunas se asigna un periodo de validez inicial de 24 meses. A continuación, se llevan a cabo pruebas de estabilidad en tiempo real para confirmar si este periodo de validez es adecuado. Deben volver a titularse periódicamente varios lotes de la vacuna a lo largo de todo el periodo de validez para determinar la estabilidad de la vacuna.

Las preparaciones de vacuna contra el VDNC adecuadamente liofilizadas, sobre todo las que incluyen un protector, como sacarosa e hidrolizado de lactoalbúmina, son estables durante más de 25 años si se guardan a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y durante 2–4 años si se guardan a  $4^{\circ}\text{C}$ . Existen pruebas de que son estables a temperaturas más altas, pero no se han llevado a cabo estudios controlados a largo plazo. Como conservante de la preparación liofilizada solo se precisa un protector, como la sacarosa y el hidrolizado de lactoalbúmina.

## 3. Vacunas desarrolladas mediante la ingeniería genética

Se está desarrollando una nueva generación de vacunas contra el capripoxvirus que utiliza el virus de la DNC como vector para la expresión y presentación de proteínas inmunoprotectoras de otros agentes patógenos de los rumiantes con la posibilidad de proporcionar protección dual (Boshra *et al.*, 2013; Wallace y Viljoen, 2005), así como dirigirse a posibles genes inmunomoduladores para inducir mejoras en las respuestas inmunitarias (Kara *et al.*, 2018).

## BIBLIOGRAFÍA

AGIANNOTAKI E.I., CHAINTOUTIS S.C., HAEGEMAN A., TASIOUDI K.E., DE LEEUW I., KATSOULOS P.D., SACHPATZIDIS A., DE CLERCQ K., ALEXANDROPOULOS T., POLIZOPOULOU Z.S., CHONDROKOUKI E.D. & DOVAS C.I. (2017). Development and validation of a TaqMan probe-based real-time PCR method for the differentiation of wild type lumpy skin disease virus from vaccine virus strains. *J. Virol. Methods*, **249**, 48–57.

BABIUK S., BOWDEN T.R., PARKYN G., DALMAN B., MANNING L., NEUFELD J., EMBURY-HYATT C., COPPS J. & BOYLE D.B. (2008). Quantification of lumpy skin disease virus following experimental infection in cattle. *Transbound. Emerg. Dis.*, **55**, 299–307.

BABIUK S., PARKYN G., COPPS J., LARENCE J.E., SABARA M.I., BOWDEN T.R., BOYLE D.B. & KITCHING R.P. (2007). Evaluation of an ovine testis cell line (OA3.Ts) for propagation of capripoxvirus isolates and development of an immunostaining technique for viral plaque visualization. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **19**, 486–491.

BALINSKY C.A., DELHON G., SMOLIGA G., PRARAT M., FRENCH R.A., GEARY S.J., ROCK D.L. & RODRIGUEZ L.L. (2008). Rapid preclinical detection of sheep pox virus by a real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 438–442.

BYADOVSKAYA O., PESTOVA Y., KONONOV A., SHUMILOVA I., KONONOVA S., NESTEROV A., BABIUK S. & SPRYGIN A. (2021). Performance of the currently available DIVA real-time PCR assays in classical and recombinant lumpy skin disease viruses. *Transbound. Emerg. Dis.*, **68**, 3020–3024. doi: 10.1111/tbed.13942. Epub 2021 May 13. PMID: 33253485.

BISWAS S., NOYCE R.S., BABIUK L.A., LUNG O., BULACH D. M., BOWDEN T.R., BOYLE D. B., BABIUK S. & EVANS D.H. (2020). Extended sequencing of vaccine and wild-type capripoxvirus isolates provides insights into genes modulating virulence and host range. *Transbound. Emerg. Dis.*, **67**, 80–97.

BOSHRA H., TRUONG T., NFOR C., GERDTS V., TIKOO S., BABIUK L.A., KARA P., MATHER A., WALLACE D. & BABIUK S. (2013). Capripoxvirus-vectored vaccines against livestock diseases in Africa. *Antiviral Res.*, **98**, 217–227.

- BOWDEN, T.R, BABIUK S.L, PARKYN G.R., COPPS J.S. & BOYLE D.B. (2008). Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology*, **371**, 380–393.
- BRENNER J., HAIMOVITZ M., ORON E., STRAM Y., FRIDGUT O., BUMBAROV V., KUZNETZOVA L., OVED Z., WASERMAN A., GARAZZI S., PERL S., LAHAV D., EDERY N. & YADIN H. (2006). Lumpy skin disease (LSD) in a large dairy herd in Israel. *Isr. J. Vet. Med.*, **61**, 73–77.
- BURDIN M.L. (1959). The use of histopathological examination of skin material for the diagnosis of lumpy skin disease in Kenya. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, **7**, 27–36.
- CAPSTICK P.B. & COAKLEY W. (1961). Protection of cattle against lumpy skin disease. Trials with a vaccine against Neethling type infection. *Res. Vet. Sci.*, **2**, 362–368
- CARN V.M. (1993). Control of capripoxvirus infections. *Vaccine*, **11**, 1275–1279.
- CARN V.M. & KITCHING, R.P. (1995). The clinical response of cattle following infection with lumpy skin disease (Neethling) virus. *Arch. Virol.*, **140**, 503–513.
- COAKLEY W. & CAPSTICK P.B. (1961). Protection of cattle against lumpy skin disease. Factors affecting small scale production of tissue culture propagated virus vaccine. *Res. Vet. Sci.*, **2**, 369–371.
- COETZER J.A.W. (2004). Lumpy skin disease. *In: Infectious Diseases of Livestock, Second Edition* Coetzer J.A.W. & Justin R.C., eds. Oxford University Press, Cape Town, South Africa, 1268–1276.
- DAS A., BABIUK S. & MCINTOSH M.T. (2012). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of capripoxviruses. *J. Clin. Microbiol.*, **50**, 1613–1620.
- DAVIES F.G. (1991). Lumpy Skin Disease, a Capripox Virus Infection of Cattle in Africa. FAO, Rome, Italy.
- DAVIES F.G., KRAUSS H., LUND L.J. & TAYLOR M. (1971). The laboratory diagnosis of lumpy skin disease. *Res. Vet. Sci.*, **12**, 123–127.
- FAY P.C., COOK C.G., WIJESIRIWARDANA N., TORE G., COMTET L., CARPENTIER A., SHIH B., FREIMANIS G., HAGA I.R. & BEARD P.M. (2020). Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells are a suitable cell line for the propagation and study of the bovine poxvirus lumpy skin disease virus. *J. Virol. Methods*, **285**, 113943. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.113943.
- FLANNERY J., SHIH B., HAGA I.R., ASHBY M., CORLA A., KING S., FREIMANIS G., POLO N., TSE A.C., BRACKMAN C.J., CHAN J., PUN P., FERGUSON A.D., LAW A., LYCETT S., BATTEN C. & BEARD P.M. (2021). A novel strain of lumpy skin disease virus causes clinical disease in cattle in Hong Kong. *Transbound. Emerg. Dis.*, doi: 10.1111/tbed.14304
- HAIG D. (1957). Lumpy skin disease. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, **5**, 421–430.
- IRELAND D.C. & BINEPAL Y.S. (1998). Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. *J. Virol. Methods*, **74**, 1–7.
- IRONS P.C., TUPPURAINEN E.S.M. & VENTER E.H. (2005). Excretion of lumpy skin disease virus in bull semen. *Theriogenology*, **63**, 1290–1297.
- KARA P.D., AFONSO C.L., WALLACE D.B., KUTISH G.F., ABOLNIK C., LU Z., VREEDE F.T., TALJAARD L.C., ZSAK A., VILJOEN G.J. & ROCK D.L. (2003). Comparative sequence analysis of the South African vaccine strain and two virulent field isolates of Lumpy skin disease virus. *Arch. Virol.*, **148**, 1335–1356.
- KARA P.D., MATHER A.S., PRETORIUS A., CHETTY T., BABIUK S. & WALLACE D.B. (2018). Characterisation of putative immunomodulatory gene knockouts of lumpy skin disease virus in cattle towards an improved vaccine. *Vaccine*, **36**, 4708–4715. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.06.017.
- KITCHING R.P. & SMALE C. (1986). Comparison of the external dimensions of capripoxvirus isolates. *Res. Vet. Sci.*, **41**, 425–427.

- LAMIEN C.E., LELENTA M., GOGER W., SILBER R., TUPPURAINEN E., MATIJEVIC M., LUCKINS A.G. & DIALLO A. (2011). Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses *J. Virol. Methods*, **171**, 134–140.
- MATHIJS E., VANDENBUSSCHE F., HAEGEMAN A., KING A., NTHANGENI B., POTGIETER C., MAARTENS L., VAN BORM S. & DE CLERCQ K. (2016). Complete Genome Sequences of the Neethling-Like Lumpy Skin Disease Virus Strains Obtained Directly from Three Commercial Live Attenuated Vaccines. *Genome Announc.*, **4** (6). pii: e01255-16. doi: 10.1128/genomeA.01255-16.
- MILOVANOVIC M., DIETZE K., MILICEVIC V., RADOJICIC S., VALCIC M., MORITZ T. & HOFFMANN B. (2019). Humoral immune response to repeated lumpy skin disease virus vaccination and performance of serological tests. *BMC Vet. Res.*, **15**, 80. doi: 10.1186/s12917-019-1831-y.
- MURRAY L., EDWARDS L., TUPPURAINEN E.S., BACHANEK-BANKOWSKA K., OURA C.A., MIOULET V. & KING D.P. (2013). Detection of capripoxvirus DNA using a novel loop-mediated isothermal amplification assay. *BMC Vet. Res.*, **9**, 90.
- OMOGA D.C.A., MACHARIA M., MAGIRI E., KINYUA J., KASIITI J. & HOLTON T. (2016). Molecular based detection, validation of a LAMP assay and phylogenetic analysis of capripoxvirus in Kenya. *J. Adv. Biol. Biotech.*, **7**, 1–12.
- PESTOVA Y., BYADOVSKAYA O., KONONOV A. & SPRYGIN A. (2018). A real time high-resolution melting PCR assay for detection and differentiation among sheep pox virus, goat pox virus, field and vaccine strains of lumpy skin disease virus. *Mol. Cell. Probes*, **41**, 57–60.
- PROZESKY L. & BARNARD B.J.H. (1982). A study of the pathology of lumpy skin disease in cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **49**, 167–175.
- ROUBY S. & ABOULSOUB E. (2016). Evidence of intrauterine transmission of lumpy skin disease virus. *Vet. J.*, **209**, 193–195.
- SAMOJLOVIC M., POLACEK V., GURJANOV V., LUPULOVIC D., LAZIC G., PETROVIĆ T., LAZIC S. (2019). Detection of antibodies against lumpy skin disease virus by virus neutralization test and ELISA methods. *Acta Vet.*, **69**, 47–60.
- SPRYGIN A., BABIN Y., PESTOVA Y., KONONOVA S., WALLACE D.B., VAN SCHALKWYK A., BYADOVSKAYA O., DIEV V., LOZOVY D. & KONONOV A. (2018). Analysis and insights into recombination signals in lumpy skin disease virus recovered in the field. *PLoS One*, **13**, e0207480.
- SPRYGIN A., VAN SCHALKWYK A., SHUMILOVA I., NESTEROV A., KONONOVA S., PRUTNIKOV P., BYADOVSKAYA O. & KONONOV A. (2020). Full-length genome characterization of a novel recombinant vaccine-like lumpy skin disease virus strain detected during the climatic winter in Russia, 2019. *Arch. Virol.*, **165**, 2675–2677.
- TUPPURAINEN E.S.M., VENTER E.H. & COETZER J.A.W. (2005). The detection of lumpy skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **72**, 153–164.
- TUPPURAINEN E.S., VENTER E.H., COETZER J.A. & BELL-SAKYI L. (2015). Lumpy skin disease: attempted propagation in tick cell lines and presence of viral DNA in field ticks collected from naturally-infected cattle. *Ticks Tick Borne Dis.*, **6**, 134–140.
- VAN ROOYEN P.J., KOMM N.A.L., WEISS K.E. & ALEXANDER R.A. (1959). A preliminary note on the adaptation of a strain of lumpy skin disease virus to propagation in embryonated eggs. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, **7**, 79–85.
- VAN SCHALKWYK A., BYADOVSKAYA O., SHUMILOVA I., WALLACE D.B. & SPRYGIN A. (2021). Estimating evolutionary changes between highly passaged and original parental lumpy skin disease virus strains. *Transbound. Emerg. Dis.*, doi: 10.1111/tbed.14326.
- VAN SCHALKWYK A., KARA P., EBERSOHN K., MATHER A., ANNANDALE C.H., VENTER E.H. & WALLACE D.B. (2020). Potential link of single nucleotide polymorphisms to virulence of vaccine-associated field strains of lumpy skin disease virus in South Africa. *Transbound. Emerg. Dis.*, **67**, 2946–2960.
- VIDANOVIC D., SEKLER M., PETROVIC T., DEBELJAK Z., VASKOVIC N., MATOVIC K. & HOFFMAN B. (2016). Real time PCR assay for the specific detection of field Balkan strain of lumpy skin disease virus. *Acta Vet. Brno*, **66**, 444–454.

WANG Y., ZHAO L., YANG J., SHI M., NIE F., LIU S., WANG Z., HUANG D., WU H., LI D., LIN H. & LI Y. (2021). Analysis of vaccine-like lumpy skin disease virus from flies near the western border of China. *Transbound. Emerg. Dis.*, doi: 10.1111/tbed.14159

WALLACE D.B. & VILJOEN G.J. (2005). Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of lumpy skin disease virus generated by using thymidine kinase gene insertion. *Vaccine*, **23**, 3061–3067.

WEISS K.E. (1968). Lumpy skin disease. *Virology Monographs*, **3**, 111–131.

\*  
\* \*

**NB:** Existen Laboratorios de Referencia de la OMSA para la dermatitis nodular contagiosa  
(puede consultarse la página web de la OMSA:

<https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OMSA para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la dermatitis nodular contagiosa.

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989: ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2023.