

PESTE DE LOS PEQUEÑOS RUMIANTES (INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA PESTE DE PEQUEÑOS RUMIANTES)

RESUMEN

Descripción de la enfermedad: La peste de los pequeños rumiantes (PPR) es una enfermedad contagiosa aguda causada por un morbilivirus de la familia Paramyxoviridae. Afecta sobre todo a las ovejas y las cabras y ocasionalmente a pequeños rumiantes salvajes. Debido al hecho de que la PPR en alguna ocasión se ha notificado en camellos, ganado vacuno y búfalos, estos animales se consideran susceptibles, pero no se ha establecido formalmente el papel que desempeñan en la circulación del virus de la PPR (VPPR). La PPR existe en todo África excepto en Sudáfrica, en la península arábiga, en la mayoría de los países del Oriente Próximo y Oriente Medio, y en Asia central y el sudeste asiático.

La enfermedad clínica es parecida a la peste bovina del ganado vacuno. Normalmente es aguda y se caracteriza por fiebre, secreciones nasales y oculares serosas, lesiones erosivas en diferentes mucosas y sobre todo en la boca, diarrea y neumonía. En la necropsia pueden detectarse erosiones en los tractos gastrointestinal y urogenital. Los pulmones pueden presentar bronconeumonía intersticial y a menudo neumonía bacteriana secundaria. También puede producirse una forma subclínica de la PPR.

La PPR debe confirmarse mediante métodos de laboratorio, ya que la lengua azul, la fiebre aftosa y otras enfermedades erosivas o vesiculares, así como la pleuropneumonía caprina contagiosa, pueden causar una enfermedad clínicamente similar.

Identificación del agente: Para llegar al diagnóstico mediante el aislamiento del virus, es importante tomar las muestras en el momento adecuado, y deberán obtenerse en la fase aguda de la enfermedad cuando, son evidentes los signos clínicos. Las muestras recomendadas de animales vivos pueden ser hisopos de secreciones conjuntivales, nasales, de las mucosas bucal y rectal, y sangre tratada con anticoagulante.

El diagnóstico se realiza mediante el enzoinmunoanálisis (ELISA) de inmunocaptura o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). También puede utilizarse la inmunoelectroforesis inversa y la inmunodifusión en gel de agar. Para condiciones de campo, existe una prueba de aplicación en la propia explotación.

Pruebas serológicas: Las pruebas serológicas utilizadas sistemáticamente son la neutralización vírica y el ELISA de competición.

Requisitos para las vacunas: Las vacunas contra la PPR vivas atenuadas eficaces se utilizan mucho. Desde la erradicación de la peste bovina a nivel mundial, está prohibido el uso de vacunas contra la peste bovina como medio de protección contra la PPR.

A. INTRODUCCIÓN

La peste de los pequeños rumiantes (PPR) es una enfermedad vírica aguda de los pequeños rumiantes caracterizada por fiebre, secreciones oculonasales, estomatitis, diarrea y neumonía, y respiración con olor fétido y molesto. Debido a los signos respiratorios, la PPR puede confundirse con la pleuroneumonía caprina contagiosa (PCC) o la pasteurelisis. En muchos casos, la pasteurelisis es una infección secundaria por PPR, como consecuencia de la inmunosupresión inducida por el virus de la PPR (VPPR). El VPPR se transmite sobre

todo mediante aerosoles entre animales que viven en contacto directo (Lefevre & Diallo, 1990). Los animales infectados presentan signos clínicos similares a los que históricamente se han observado con la peste bovina en el ganado vacuno, aunque son enfermedades causadas por distintas especies de virus.

El VPPR se ha clasificado dentro del género *Morbillivirus* de la familia Paramyxoviridae (Gibbs *et al.*, 1979) teniendo en cuenta su semejanza con los virus de la peste bovina, el moquillo canino y el sarampión. Los virus de este grupo tienen seis proteínas estructurales: la proteína de la nucleocápsida (Np), que encapsula el ARN genómico vírico, la fosfoproteína (P), que se asocia a la proteína de la polimerasa (L viene de “large”, que en inglés hace referencia a una proteína de gran tamaño), la proteína de la matriz (M), la proteína de fusión (F) y la de hemoaglutinación (H). La proteína de la matriz, íntimamente asociada con la cara interna de la envoltura vírica, hace de enlace entre la nucleocápsida y las glucoproteínas externas H y F, que son responsables, respectivamente, de la unión y de la penetración del virus en el interior de las células a las que infecta. El genoma del VPPR también codifica dos proteínas no estructurales, la C y la V.

La PPR fue descrita por primera vez en Costa de Marfil (Gargadennec & Lalanne, 1942). Desde finales de los años 1990, se ha propagado hasta cubrir grandes regiones de África, desde el norte hasta Tanzania, así como de Oriente Medio, y también se ha propagado a países desde Asia central hasta el sur y el este asiático (revisado en Banyard *et al.*, 2010).

La enfermedad natural afecta principalmente a las cabras y a las ovejas. Por lo general, se considera que el ganado vacuno solo resulta infectado de forma natural y subclínicamente, aunque en los años 50 se describió la enfermedad y la muerte de terneros infectados experimentalmente con tejido infectado por el VPPR, y el VPPR se aisló en India (1995) a partir de un brote de la enfermedad similar a la peste bovina en los búfalos. En algunas muestras de una enfermedad epizootica que afectó a dromedarios en Etiopía y Sudán se detectaron anticuerpos contra el VPPR así como antígeno y ácido nucleico del VPPR. La PPR afecta a varias especies salvajes del orden *Artiodactyla*, algunas de las cuales están seriamente amenazadas, como el antílope saiga. El venado de cola blanca americano (*Odocoileus virginianus*) puede ser infectado experimentalmente por el VPPR. Pueden tener lugar infecciones duales por otros virus, como pestivirus o el virus de la viruela caprina.

El período de incubación suele ser de 4–6 días, pero puede oscilar entre los 3 y los 10 días. La enfermedad clínica es aguda, con fiebre alta (hasta 41°C) que puede durar 3–5 días; los animales muestran decaimiento, anorexia y hocico reseco. Las secreciones oculonasales serosas se vuelven progresivamente mucopurulentas y, si no se produce la muerte, persisten unos 14 días. En los cuatro días siguientes a la aparición de la fiebre, las encías se vuelven hiperémicas y aparecen lesiones erosivas en la cavidad oral, produciéndose una abundante sialorrea. Estas lesiones pueden volverse necróticas. En la última etapa es frecuente una diarrea sanguinolenta acuosa. También provoca neumonía, tos, crepitaciones pleurales y respiración abdominal. La tasa de morbilidad puede llegar incluso al 100% y la tasa de mortalidad puede ser muy alta en los casos graves. No obstante, tanto la morbilidad como la mortalidad pueden ser muy inferiores en los brotes más leves, de tal modo que la enfermedad puede pasar desapercibida. Puede establecerse un diagnóstico provisional de la PPR en base a los signos clínicos, pero para el diagnóstico diferencial con otras enfermedades de signos similares se requiere la confirmación del laboratorio.

Las lesiones son muy similares a las observadas en la necropsia en el ganado vacuno afectado por la peste bovina, con la salvedad de que en la PPR aparecen con frecuencia llamas costras en la parte externa de los labios y neumonía intersticial. Asimismo, pueden aparecer lesiones erosivas desde la boca hasta la unión del rumen con el retículo. Pueden aparecer unas características zonas rojas lineales de congestión o hemorragia a lo largo de los pliegues longitudinales de la mucosa del intestino grueso y del recto (rayas de cebra), pero no son un hallazgo constante. Normalmente hay enteritis erosiva o hemorrágica y la unión ileocecal suele estar afectada. Las placas de Peyer podrían estar necróticas. Los ganglios linfáticos están aumentados de tamaño, y el bazo y el hígado podrían presentar lesiones necróticas..

No se conocen los posibles riesgos para la salud de los trabajadores que están en contacto con el VPPR, ya que no se tiene constancia de la infección por el virus en humanos. La manipulación en el laboratorio debe llevarse a cabo a un nivel de contención adecuado determinado por un análisis del riesgo biológico (véase el capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

En la Tabla 1 se muestra una lista de todos los tipos de pruebas de las que se dispone para el diagnóstico de la PPR. Estas pruebas, cuando se aplican a animales determinados o a poblaciones, pueden tener distintas finalidades, como confirmar el diagnóstico de casos clínicos, determinar si existe o no infección, para decidir si los animales pueden o no ser comercializados o trasladados, estimar la prevalencia de la infección o la exposición (vigilancia) o comprobar el estado inmunitario post-vacunación (seguimiento).

Tabla 1. Métodos disponibles para el diagnóstico de la peste de los pequeños rumiantes y su propósito.

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales concretos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos sospechosos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia en el rebaño/manada	Determinar el estado inmunitario en animales concretos o en poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente¹						
RT-PCR	–	++	++	+++	+	–
RT-PCR en tiempo real	–	++	+++	+++	+	–
Aislamiento del virus en cultivo celular	–	–	–	++	–	–
ELISA de inmunocaptura	–	+	++	+++	+	–
Prueba de aplicación a pie de explotación (LFD)	–	–	++	++	–	–
AGID	–	–	+	+	–	–
Inmunolectroforesis inversa	–	–	–	+	–	–
Detección de respuesta inmunitaria						
Neutralización vírica	+++	+++	–	++	++	++
ELISA de competición	+++	+++	+++	+	+++	+++
AGID	–	–	+	+	–	+
Inmunolectroforesis inversa	–	–	–	+	–	–

Clave: +++ = método recomendado, validado para el propósito indicado; ++ = método adecuado, pero puede precisar una validación posterior; + = puede utilizarse en ciertas situaciones, pero el coste, la fiabilidad u otros factores limitan considerablemente su aplicación; – = no adecuado para esta finalidad; n/a = propósito no aplicable.
 ELISA=enzimoinmunoanálisis; LFD = dispositivo de flujo lateral; AGID = inmunodifusión en gel de agar.

1. Obtención de muestras

Las muestras para el aislamiento del virus deben enviarse refrigeradas al laboratorio. En los animales vivos se toman hisopos de las secreciones de la conjuntiva o de las mucosas nasal, bucal o rectal. Durante la primera fase de la enfermedad también se extrae también sangre entera en anticoagulante para el aislamiento del virus, para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y para las pruebas hematológicas (como anticoagulante puede utilizarse tanto EDTA como heparina, aunque el primero es preferible en el caso de muestras que se analicen mediante PCR). En la necropsia también deben tomarse muestras asépticamente (de dos a tres animales) de los ganglios linfáticos, en particular de los ganglios mesentéricos y bronquiales, de los pulmones, del bazo y de la mucosa intestinal; deben enfriarse en hielo y transportarse refrigeradas. Las muestras de órganos obtenidas para el estudio histopatológico se colocan en formalina tamponada neutra al 10%. Es aconsejable recoger sangre para realizar el diagnóstico serológico en cualquier fase, pero en particular al final del brote.

¹ Se recomienda aplicar varios métodos de identificación del agente a una misma muestra clínica.

2. Identificación del agente

2.1. Enzimoimmunoanálisis de inmunocaptura

El enzimoimmunoanálisis de inmunocaptura (IC-ELISA) (Libeau *et al.*, 1994) en el que se utilizan dos anticuerpos monoclonales (MAb) generados contra la proteína N permite una rápida identificación del VPPR.

En los Laboratorios de Referencia de la OIE para la PPR se ofrece consejo sobre el uso y la aplicabilidad del IC-ELISA. Existe un kit comercial de esta prueba. Deben seguirse las instrucciones proporcionadas por el proveedor del kit. El principio general del mismo es el siguiente:

- i) Los pocillos vienen recubiertos con anticuerpo anti-VPPR-N.
- ii) Las muestras problema, y los controles incluidos, se añaden a los pocillos. El VPPR, si lo hay, forma un complejo anticuerpo-antígeno.
- iii) Tras el lavado, se añade un anticuerpo MAb anti-VPPRN conjugado a peroxidasa de rábano (HRP), formando un complejo anticuerpo-antígeno-MAb-HRP.
- iv) Tras un lavado posterior para eliminar el exceso de conjugado, se añade la solución sustrato (TMB: tetrametilbenzidina). La coloración resultante depende de la calidad del VPPR presente en la muestra problema. En presencia de VPPR, aparece una coloración azul que se vuelve amarilla tras añadir la solución de parada. En ausencia de VPPR, no aparece coloración. La microplaca se lee a 450 nm.

La prueba es muy específica y sensible (puede detectar $10^{0,6}$ DICT₅₀/pocillo de VPPR). Los resultados se obtienen en menos de 2 horas.

En la India se utiliza mucho IC-ELISA (Singh *et al.*, 2004): primero se deja reaccionar la muestra con el MAb de detección y después un MAb o un anticuerpo policlonal adsorbido a la placa de ELISA captura el inmunocomplejo. Esta prueba muestra una alta correlación con la prueba de la infectividad celular (DICT₅₀) con un límite de detección mínimo de 10^3 DICT₅₀/ml.

2.2. Métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos

Se han desarrollado PCR con transcripción inversa (RT-PCR) basadas en la amplificación de partes de los genes de las proteínas N y F para el diagnóstico específico de la PPR (Couacy-Hymann *et al.*, 2002). Esta técnica es 1.000 veces más sensible que la titulación clásica del virus en células Vero (Couacy-Hymann *et al.*, 2002) con la ventaja de que los resultados se obtienen en 5 horas, incluida la extracción de ARN, en comparación con los 10-12 días que tarda el aislamiento del virus. Los dos protocolos más utilizados se indican con cierto detalle abajo. Se ha descrito una RT-PCR múltiple, basada en la amplificación de fragmentos de genes de las proteínas N y M (George *et al.*, 2006). También se ha descrito otro formato de la RT-PCR basada en el gen de la proteína N (Saravanan *et al.*, 2004). En vez de analizarse el producto amplificado –el amplicón– mediante electroforesis en geles de agarosa, se le detecta en una placa mediante un ELISA en el que se utiliza una sonda marcada. Este RT-PCR-ELISA resulta diez veces más sensible que la RT-PCR clásica.

Durante los últimos años, los métodos de amplificación de los ácidos nucleicos para el diagnóstico de la PPR han mejorado considerablemente con la RT-PCR en tiempo real cuantitativa (Bao *et al.*, 2008; Batten *et al.*, 2011; Kwiatek *et al.*, 2010). Este método también es diez veces más sensible que la RT-PCR convencional, y además minimiza el riesgo de contaminación; también se ha descrito una RT-PCR en tiempo real específica de cepas del linaje IV (Li *et al.*, 2016). Una alternativa a la RT-PCR es la amplificación isotérmica mediada por bucle (Li *et al.*, 2010). La sensibilidad de esta prueba parece ser similar a la de la RT-PCR en tiempo real; es sencilla de implementar y rápida, y el resultado puede leerse a simple vista.

En todos los casos, el ARN se debe purificar a partir de muestras de sangre o de tejido. El ARN vírico se puede purificar a partir de bazo (no es lo ideal debido a su alto contenido en sangre), ganglios linfáticos o amígdalas, tejido pulmonar, sangre completa, capa leucocitaria o linfocitos periféricos purificados (PBL), o hisopos oculares o nasales. Las muestras de tejido debe obtenerse con fenol tiocianato de guanidinio-fenol acidificado empleando una de las preparaciones comerciales existentes. Las muestras sólidas (0,5-1,0 g) se trituran y homogeneizan con 10 ml de reactivo. Se pueden obtener hisopos conjuntivales, orales o nasales, y las muestras de sangre completa, capa leucocitaria o PBL se pueden homogeneizar con el mismo reactivo; a continuación, el ARN se purifica siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de los tejidos, la sangre, los leucocitos o los hisopos, también resulta adecuada la extracción del ARN mediante perlas magnéticas o columnas de centrifugación. El

ARN obtenido se conserva a -70°C (o a -20°C si no se dispone de los medios para la congelación a -70°C) hasta que sea necesario.

Aunque una RT-PCR en tiempo real es el método de elección para los laboratorios que disponen del equipo necesario, ninguna de las pruebas existentes ha demostrado ser satisfactoria para todas las cepas de VPPR. Dado que es un ámbito que avanza mucho, se aconseja a los usuarios que contacten con los Laboratorios de Referencia de la OIE y de la FAO² para la PPR (en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre*) para pedir consejo sobre cuáles son las técnicas más adecuadas.

2.2.1. RT-PCR para el diagnóstico del VPPR en base a la amplificación de parte del gen N

Las pruebas que se describen en este apartado y los siguientes requieren: un kit de RT-PCR de un solo paso, agua destilada, los cebadores correspondientes, un termociclador y reactivos y equipo para la electroforesis en gel de agarosa. En cada caso, la receta para la mezcla primaria y las condiciones de ciclado indicadas corresponden a un kit específico de RT-PCR de un solo paso; se podrían utilizar otros reactivos, pero deberían estar optimizados y validados para su uso en la prueba en cuestión.

La amplificación del gen N se basa en el protocolo inicial descrito por Couacy-Hymann *et al.* (2002) en un método de RT-PCR de un solo paso. La RT-PCR convencional basada en los cebadores descritos aquí permite detectar los cuatro linajes víricos. Podrían utilizarse otros cebadores que tengan por diana el gen N, pero en tal caso, la prueba podría no resultar útil para este fin.

- i) Secuencias de los cebadores utilizados:

Cebador Secuencia

NP3: 5'-GTC-TCG-GAA-ATC-GCC-TCA-CAG-ACT-3';

NP4: 5'-CCT-CCT-CCT-GGT-CCT-CCA-GAA-TCT-3'.

- ii) Se prepara cada dilución del cebador añadiendo 5 μl de la solución primaria de cebador (100 μM) a 45 μl de agua destilada. Se obtiene una concentración de cebador de 10 μM con un volumen final de 50 μl .
- iii) Se añaden 5 μl de ARN molde a 45 μl de mezcla primaria de PCR que contenga:

Reactivo	Mezcla (1 reacción)	Concentración final
Agua destilada	15 μl	
Tampón de RT-PCR 5x	10 μl	1x
Mezcla dNTP	2 μl	
Solución Q	10 μl	
Cebador NP3 (10 μM)	3 μl	0,6 μM
Cebador NP4 (10 μM)	3 μl	0,6 μM
Mezcla enzimática	2 μl	
Volumen final	50 μl	

- iv) Se utiliza agua destilada (5 μl) en lugar de ARN para aportar un control negativo, que tiene que incluirse en cada juego de PCR.

- v) Las condiciones del termociclador se ajustan del siguiente modo:

50°C durante 30 minutos	1 ciclo	Paso de transcripción inversa
95°C durante 15 minutos	1 ciclo	Inactiva la RT y activa la polimerasa
94°C durante 30 segundos		
60°C durante 30 segundos	40 ciclos	Amplificación del cDNA mediante PCR
72°C durante 1 minuto		

2 Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

72°C durante 5 minutos	1 ciclo	Extensión final
4°C (indefinido)	–	–

- vi) La RT-PCR da un producto de amplificación de 351 pb. 10 µl de estos productos se analizan mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%. En todos los resultados positivos, 40 µl del producto final pueden utilizarse directamente para la secuenciación.

2.2.2. RT-PCR para el diagnóstico del VPPR basada en la amplificación de parte del gen F

Esta prueba se basa en la publicada inicialmente en Forsyth *et al.* (2003). Igual que ocurre con la PCR para el gen N, detecta virus de los cuatro linajes.

- i) Secuencias de los cebadores utilizados en este protocolo:

Cebador	Secuencia
F1b	5'-AGT-ACA-AAA-GAT-TGC-TGA-TCA-CAG-T-3'
F2d	5'-GGG-TCT-CGA-AGG-CTA-GGC-CCG-AAT-A-3'
F1	5'-ATC-ACA-GTG-TTA-AAG-CCT-GTA-GAG-G-3'
F2	5'-GAG-ACT-GAG-TTT-GTG-ACC-TAC-AAG-C-3'

- ii) La primera fase de esta prueba consiste en una reacción RT-PCR de un solo tubo en la que se emplean los cebadores F1b y F2d para el VPPR diseñados contra el gen F del VPPR. El protocolo proporcionado se ha validado empleando un kit comercial, pero podrían utilizarse otros reactivos si se comprueban y validan adecuadamente.
- iii) Se combinan 20 µl de la mezcla de reacción con 5 µl de ARN en un tubo de PCR de 0,5 ml. Cada prueba requiere, como mínimo, la muestra, el control negativo, el control positivo y control sin molde (agua sin ARNasa en lugar de muestra de ARN).
- iv) Se transfieren las reacciones a un termociclador y se empieza el siguiente programa:

50°C durante 30 minutos	1 ciclo	Paso de transcripción inversa
94°C durante 2 minutos	1 ciclo	Inactiva la RT y activa la polimerasa
94°C durante 1 minuto		
55 °C durante 1 minuto	35 ciclos	Amplificación de ADNc mediante PCR
72°C durante 1 minuto		
72°C durante 7 minutos	1 ciclo	Extensión final
4°C (indefinido)	–	–

- v) Se analizan 10 µl del producto de la reacción mediante electroforesis en gel de agarosa empleando gel de agarosa al 2% en tampón TBE o bien TAE. Si lo hay, el ARN del VPPR se amplificará dando un fragmento de ADN de 447 pb. Si no se observa producto de ADN, o bien un producto de ADN muy débil, puede realizarse una segunda ronda de PCR para aumentar la cantidad de producto de la PCR. esta PCR anidada se puede llevar a cabo empleando los cebadores F1 y F2 y todo reactivo y enzima de calidad de la PCR que hayan sido adecuadamente validados;
- vi) Se combinan 24 µl de mezcla de reacción con 1 µl del producto de la PCR de primera fase en un tubo de PCR de 0,5 ml. Cada prueba requiere, como mínimo, la muestra, el control negativo, el control positivo y un control sin molde (agua sin ARNasa en lugar del producto de la PCR). Se transfieren las reacciones a un termociclador y se inicia el siguiente programa:

94°C durante 3 minutos	1 ciclo	Activa la polimerasa
94°C durante 1 minuto		
55°C durante 1 minuto	35 ciclos	Amplificación de ADNc mediante PCR
72°C durante 1 minuto		
72°C durante 10 minutos	1 ciclo	Extensión final
4°C (indefinido)	–	–

- vii) Se analizan 10 µl del producto de la reacción mediante electroforesis en gel de agarosa utilizando un gel de agarosa al 2% en tampón TBE o TAE. Si lo hay, el producto de la PCR realizada para detectar el VPPR se amplificará dando un fragmento de ADN de 371 pb.

- viii) El producto de ADN restante de muestras positivas identificadas en apartado 2.4.2.v o vii puede purificarse y someterse a secuenciación del ADN.

2.3. Métodos de cultivo y aislamiento

Incluso cuando el diagnóstico se haya realizado empleando técnicas rápidas, el virus deberá aislarse siempre en cultivos de tejidos a partir de muestras de campo para estudios posteriores.

Desafortunadamente, el aislamiento del VPPR empleando este tipo de células no siempre funciona en el primer pase y pueden ser necesarios múltiples pases ciegos. Recientemente, se han desarrollado derivados de líneas celulares (Vero, CV1) que expresan el receptor del morbilivirus, la molécula indicadora de activación de los linfocitos (SLAM o CD150), que permiten el aislamiento de virus naturales de muestras anatomopatológicas en menos de 1 semana, sin necesidad de pases ciegos. Estos son el derivado de la línea de células de mono CV1 que expresa la SLAM de cabra (Adombi *et al.*, 2011) y derivados de células Vero que expresan la SLAM de perro. Se inoculan cultivos en monocapa con el material del que se sospecha (material de hisopo, de la capa leucocitaria o de suspensiones de tejido al 10%) y se examinan diariamente para comprobar si aparece efecto citopático (ECP). El ECP producido por el VPPR puede aparecer en 5 días y consiste en un redondeado y agregación celulares que culminan en la formación de sincitios en las células de riñón de cordero y en las líneas celulares que expresan SLAM. En las células Vero no modificadas a veces resulta difícil ver los sincitios. En el caso de que existan, son muy pequeños. Sin embargo, en las células Vero infectadas y teñidas con hematoxilina y eosina siempre se observan pequeños sincitios. Estos se reconocen por una disposición circular de los núcleos dando la impresión de una “esfera de reloj”. Los cultivos en cubreobjetos pueden producir un ECP antes de 5 días. También hay inclusiones intracitoplasmáticas e intranucleares. Algunas células están vacuolizadas. En los cortes histopatológicos de tejidos infectados teñidos pueden observarse alteraciones celulares similares. Después de 5–6 días, se realizarán siempre pases ciegos, ya que el ECP puede tardar algún tiempo en aparecer.

2.4. Prueba de campo para detección de antígeno del VPPR

Existen pruebas comerciales de detección de antígeno del VPPR para su uso en condiciones de campo. Estas pruebas se basan en la denominada tecnología de flujo lateral. Se obtienen hisopos conjuntivales, nasales u orales de los animales sospechosos, los hisopos se lavan con tampón y dicho tampón se aplica a un extremo de una tira cromatográfica. La muestra se mezcla con perlas coloreadas recubiertas de un Mab específico que reconoce el antígeno del VPPR. El flujo del tampón hace desplazar las perlas a lo largo de la tira cromatográfica. Si la muestra contiene el antígeno de VPPR capturado por el hisopo, este se unirá a las perlas y, a continuación, el complejo antígeno-perlas será capturado por una línea de MAb anti-VPPR situada a mitad de camino de la tira, creando una línea coloreada que indicará un resultado positivo. En ausencia de antígeno del VPPR, no se unirá ninguna perla a la línea de la prueba. Estas pruebas tardan 20 minutos en completarse y no requieren ningún otro material. Ambas se han validado para cepas del VPPR de los cuatro linajes, y presentan una sensibilidad similar a la del IC-ELISA y un 100% de especificidad en condiciones de laboratorio. También se ha validado otra prueba en condiciones de campo en Côte d'Ivoire, Etiopía, Pakistán y Uganda (Baron *et al.*, 2014). Estas pruebas están diseñadas para su uso con hisopos externos y no son adecuadas para utilizar con muestras de sangre o de tejidos.

2.5. Inmunodifusión en gel de agar

La inmunodifusión en gel de agar (AGID) es una prueba muy sencilla y barata que puede realizarse en cualquier laboratorio e incluso sobre el terreno. El antígeno estándar del VPPR se prepara a partir de muestras infectadas de ganglios linfáticos mesentéricos o bronquiales, bazo o pulmón, que se trituran y se convierten en suspensión a 1/3 (p/v) en solución salina tamponada (Durojaiye *et al.*, 1983). Se centrifugan a 500 *g* durante 10–20 minutos y el líquido sobrenadante se guarda en alícuotas a –20°C. El algodón del hisopo empleado para tomar las muestras nasales o conjuntivales, se quita mediante una hoja de bisturí y se introduce en una jeringa de 1 ml. La muestra se extrae con 0,2 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) expulsando y llenando repetidamente los 0,2 ml de PBS en un tubo Eppendorf, utilizando el émbolo de la jeringa. La muestra resultante extraída del hisopo conjuntival o nasal, así como el material de tejido triturado preparado con anterioridad pueden guardarse a –20°C hasta su utilización. Pueden conservarse 1–3 años. El antígeno de control negativo se prepara de forma similar a partir de tejidos normales. Se obtiene antisuero estándar hiperinmunizando a ovejas con 1 ml de VPPR con un título de 10⁴ DICT₅₀ (dosis que resulta infectiva en el 50% de los cultivos tisulares expuestos) por mililitro suministrado a intervalos semanales durante 4 semanas. Se sangra a los animales entre 5 y 7 días después de la última inoculación (Durojaiye, 1982).

- i) Se dispensa agar al 1% en una solución salina normal, que contenga tiomersal (0,4 g/litro) o acida sódica (1,25 g/litro) como agente bacteriostático, en placas de Petri (6 ml/placa de 5 cm).
- ii) Se excavan pocillos en el agar siguiendo un patrón hexagonal, con un pocillo central. Los pocillos miden 5 mm de diámetro y están separados entre ellos 5 mm.
- iii) El pocillo central se llena con el antisuero positivo; tres de los pocillos periféricos se llenan con el antígeno positivo y uno con el antígeno negativo. Los dos pocillos periféricos restantes se llenan con el antígeno problema, de forma que los antígenos problema y el antígeno control negativo se alternen con los antígenos control positivo.
- iv) Normalmente, tras 18–24 horas a temperatura ambiente aparecerán de 1 a 3 líneas de precipitado entre el suero y los antígenos (Durojaiye *et al.*, 1983). Estas líneas se intensifican lavando el agar con ácido acético glacial al 5% durante 5 minutos (este procedimiento se llevará a cabo con todas las pruebas aparentemente negativas antes de registrar el resultado como negativo). Las reacciones positivas mostrarán líneas de identidad con el antígeno control positivo.

Los resultados se obtienen en un día, pero la prueba no es suficientemente sensible como para detectar formas leves de la PPR, debido a la baja cantidad de antígeno vírico que se excreta.

2.6. Contrainmunoelectroforesis

La contrainmunoelectroforesis (CIEF) es una versión más rápida de la AGID (Majiyagbe *et al.*, 1984). Se lleva a cabo sobre una superficie horizontal empleando una cubeta de electroforesis apropiada que consta de dos compartimientos conectados a través de un puente. El aparato se conecta a una fuente de alto voltaje. Sobre el portaobjetos se dispensan volúmenes de 3 ml de agarosa o de agar (1–2%, [p/v]) disuelto en tampón acetato barbital 0,025 M. Se excavan de seis a nueve pares de pocillos en el agar solidificado. Los reactivos utilizados son los mismos que se emplean para la AGID. El baño de electroforesis se llena con tampón acetato barbital 0,1 M. Los pares de pocillos del agar se llenan con los reactivos, disponiendo los sueros en los pocillos del ánodo y el antígeno en los pocillos del cátodo. Se coloca el portaobjetos en el puente de conexión y los extremos se conectan al tampón de las cubetas mediante papel poroso húmedo. Se cubre el aparato y se aplica una corriente de 10–12 miliamperios por portaobjeto durante 30–60 minutos. Se desconecta la corriente y se observan los portaobjetos con luz intensa. La presencia de 1–3 líneas de precipitación entre pares de pocillos se considera una reacción positiva. No deberá haber reacciones entre los pocillos que contengan los controles negativos.

3. Pruebas serológicas

Las cabras y las ovejas infectadas por el VPPR desarrollan anticuerpos que pueden ponerse de manifiesto para respaldar un diagnóstico basado en los signos clínicos, pero estos anticuerpos también pueden generarse como consecuencia de la vacunación con cualquiera de las vacunas actuales contra el VPPR. Las pruebas que se suelen utilizar de forma rutinaria son la neutralización vírica (VNT) y la técnica del ELISA de competición.

3.1. Neutralización vírica

Aunque esta prueba es sensible y específica, su ejecución lleva mucho tiempo. La prueba estándar de neutralización ahora se suele llevar a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos, aunque también pueden emplearse cultivos rotatorios. Es preferible usar células Vero, pero también pueden emplearse células renales primarias de cordero.

Esta prueba requiere los siguientes materiales: suspensiones celulares a razón de 600.000/ml; placas de cultivo celular de 96 pocillos; sueros a titular (inactivados por calor a 56°C durante 30 minutos); medio de cultivo celular completo; VPPR diluido para obtener 1000, 100, 10 y 1 DICT₅₀/ml.

- i) Se diluyen los sueros a 1/5, y a continuación se hacen diluciones seriadas a la mitad en el medio de cultivo celular.
- ii) Se mezclan 100 µl de virus con 1.000 DICT₅₀/ml (para obtener 100 DICT₅₀ en cada pocillo) y 100 µl de una dilución dada de suero (empleando seis pocillos por dilución) en los pocillos de la placa de cultivo celular.
- iii) Se dispone una serie de pocillos control para el virus y para células no infectadas del siguiente modo: seis pocillos con 100 DICT₅₀ (100 µl) por pocillo; seis pocillos con 10 DICT₅₀ (100 µl) por pocillo; seis pocillos con 1 DICT₅₀ (100 µl) por pocillo; seis pocillos con 0,1 DICT₅₀ (100 µl) por pocillo; y seis pocillos con 200 µl de cultivo sin virus (células control) por pocillo.

- iv) Se completan los pocillos que contienen los controles del virus hasta los 100 µl con medio de cultivo completo, y se incuban las placas durante 1 hora a 37°C.
- v) Se añaden 50 µl de suspensión celular a cada pocillo. Se incuban las placas a 37°C en presencia de CO₂.
- vi) Se leen las placas tras 1 y 2 semanas de incubación. Los resultados deben ser los siguientes:

Si la dilución del virus se ha realizado correctamente, se observará ECP en el 100% de los pocillos control con virus que contengan 100 y 10 DICT₅₀/pocillo, ECP en el 50% de los pocillos cuya dilución sea de 1 DICT₅₀/pocillo, y ausencia de ECP en todos los pocillos cuya dilución sea de 0,1 DICT₅₀/pocillo. Esta prueba solo es válida si el virus se ha diluido adecuadamente.

Para la titulación del suero, no habrá ECP en los pocillos en los que, durante la prueba, el suero haya neutralizado al virus; cualquier nivel de ECP significará que el suero no ha neutralizado al virus. El título de neutralización es la dilución de suero que neutraliza al virus en la mitad de los pocillos. Un título de neutralización superior a 10 es positivo.

3.2. Enzimoimmunoanálisis de competición

Se han descrito varios ELISA de competición (C-ELISA) que se basan en el uso de MAb que reconocen proteínas del virus. Son de dos tipos: aquellos cuyo MAb reconoce la proteína N y emplean proteína N recombinante producida en baculovirus como antígeno (p. ej., Libeau *et al.*, 1995); y aquellos que utilizan un MAb específico de la proteína vírica de adhesión (H) y un antígeno que consiste en VPPR purificado o parcialmente purificado (cepa vacunal) (p. ej., Anderson & McKay, 1994; Saliki *et al.*, 1993). Todas las pruebas funcionan en base al principio de que los anticuerpos contra el VPPR de los sueros problema pueden bloquear la unión del MAb al antígeno.

En los Laboratorios de Referencia de la OIE para la PPR se da consejo sobre el uso y la aplicabilidad de los ELISA. Algunos métodos existen en forma de kit comercial, los cuales constituyen la única forma viable de llevar a cabo esta prueba. Antes de su uso, los laboratorios deben asegurarse de que el kit se haya validado de acuerdo con la Norma de Validación de la OIE (véase el capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*). La única alternativa sería que un laboratorio desarrollara y validara todos los reactivos (monoclonales y antígenos) a nivel interno.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se indican en el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices que se dan a continuación y en el capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden complementarse con los requisitos nacionales y regionales.

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

Las ovejas y las cabras vacunadas con una cepa atenuada de PPR o que se recuperan de la PPR desarrollan una inmunidad activa de por vida contra la enfermedad (Durojaiye, 1982). Se dispone de varias vacunas contra la PPR, todas las cuales son cepas naturales del VPPR atenuadas en cultivo celular (Sen *et al.*, 2010). Se ha comprobado en ensayos experimentales que las dos cepas vacunales más utilizadas (Nigeria/75/1 and Sungri/96) protegen a los animales contra cepas del VPPR de todos los linajes (Hodgson *et al.*, 2018); en muchos países también se ha comprobado que la vacuna Nigeria/75/1 proporciona dicha protección completa frente a todos los linajes utilizándola en condiciones de campo. Aquí se describe la producción y validación de vacuna a partir de cepas del VPPR atenuado disponible en el mercado.

2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas convencionales

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

Debe conocerse y registrarse bien el historial de la vacuna recibida y almacenada en el laboratorio como inóculo primario: el origen de la vacuna, el número de pases en cultivo celular

y el rango del número de pases en cultivo celular que se ha comprobado y demostrado que es eficaz en cuanto a protección en animales contra la PPR durante al menos 3 años cuando se administra a la dosis recomendada. Esta cepa vacunal del virus de la PPR no debe ser excretada por parte de los animales inoculados de una forma tal que pueda transmitirse a los animales que contactan con aquellos. Debe demostrarse que la cepa vacunal no ha revertido a la virulencia tras al menos tres pases inversos en ovejas y cabras (Diallo *et al.*, 1989).

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

El inóculo debe controlarse y demostrarse que está libre de contaminación bacteriana, fúngica y micoplásmica. Debe demostrarse que está libre de pestivirus y otros virus que puedan contaminarlo. El inóculo debe haber superado una prueba de inocuidad en animales (roedores, ovejas y cabras) y debe haberse comprobado su eficacia para la protección de ovejas y cabras contra la PPR a la dosis recomendada.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

Una vez el fabricante ha recibido muestras de una institución que cuente con el banco de vacunas contra el VPPR (el inóculo primario), deberá preparar lotes de inóculo de trabajo primario y secundario. El lote de inóculo de producción, a partir del cual se produce la vacuna final, se prepara a partir del inóculo de trabajo secundario. Preparando inóculos de trabajo primarios y secundarios, se evita la necesidad de tener que llevar a cabo un gran número de pases después del inóculo primario para producir la vacuna. De esta forma, es posible cumplir con una de las recomendaciones de la OIE: 5-10 pases como máximo tras el inóculo primario (véase el capítulo 1.1.8).

i) Lotes de inóculo de trabajo primario y secundario

Al preparar lotes de inóculo de trabajo primario y secundario es importante evitar infectar las células con dosis altas del virus (alta multiplicidad de infección [m.d.i]), ya que ello conduciría a la acumulación de partículas defectuosas en la suspensión de virus producida, lo cual disminuiría el título de productos posteriores. Por otra parte, una m.d.i. muy baja (por ejemplo, de 0,0001) prolongaría el tiempo de cultivo. El fabricante es el responsable de optimizar el flujo de trabajo durante la producción, tanto respecto a las propias células como al medio de cultivo; no obstante, a modo orientativo, en cada etapa las infecciones deben estar a una m.d.i de 0,001-0,01.

El contenido liofilizado de un frasco del banco de inóculo se reconstituye en 2 ml de medio de cultivo celular sin suero. Este líquido se mezcla con células Vero, si la vacuna se produce en células Vero, suspendidas en un medio de cultivo completo para proporcionar como mínimo 0,001 DICT₅₀ por célula. Se llenan frascos de cultivo celular con esta mezcla de virus/célula (alrededor de 2×10^7 células Vero en un frasco de 175 cm²), y se incuban a 37°C. Las células cultivadas se observan regularmente para comprobar si presentan ECP. El medio se renueva cada dos días, reduciendo la proporción de suero al 2% una vez que la monocapa de células esté completa. El virus se recoge por primera vez cuando el ECP es del 40–50%. Esta suspensión vírica se guarda a –70°C. Se realizan recogidas sucesivas cada dos días hasta que el ECP alcanza el 70–80%, momento en el que se procede a la congelación de los frascos de cultivo (por lo general, pueden hacerse al menos dos recogidas más antes de la congelación final de las placas de cultivo). Todas las suspensiones de virus recogidas se someten a dos ciclos de congelación-descongelación. Todas las suspensiones de virus recogidas se someten a dos ciclos de congelación-descongelación, y a continuación se combinan para formar un solo lote, que sirve de lote de inóculo primario. A su vez, este se divide en pequeños volúmenes en botellas y se conserva a –70°C. El contenido de cinco de estas botellas se descongela y se titula (el título mínimo que se requiere es 10⁵ DICT₅₀/ml). Es mejor liofilizar este inóculo con el fin de guardarlo a –20°C. En este caso será necesario titular el virus liofilizado (cinco botellas). Un lote preparado de esta forma debe superar todas las pruebas de esterilidad.

ii) Preparación del lote de inóculo de producción

El lote de inóculo de producción se prepara en las mismas condiciones que el lote de inóculo de trabajo. Se obtiene así una gran reserva de virus, a partir de la cual se preparará la vacuna final. Este lote se distribuye en recipientes que se guardan a –70°C.

Además, debe superar las pruebas de esterilidad. Se titulan cinco muestras (el título mínimo requerido es 10^6 DICT₅₀/ml).

iii) Validación como vacuna

Es necesario confirmar o descartar la presencia del VPPR en el producto que se analiza. Con este fin, se utiliza un suero anti-VPPR para neutralizar el virus en cultivo celular.

• Procedimiento analítico

- a) Se mezcla el contenido de dos frascos de vacuna con agua bidestilada estéril para obtener un volumen igual al volumen previo a la liofilización.
- b) Se hacen diluciones decimales de la vacuna reconstituida en medio de cultivo libre de suero (0,5 ml de suspensión vírica + 4,5 ml de medio).
- c) A partir de cada frasco, se realizan dos series de mezclas para las diluciones de virus, en placas de 96 pocillos, de la siguiente forma:

Serie 1:	Diluciones de la suspensión vírica:	-1	-2	-3	-4
	Suspensión vírica (en μ l)	50	50	50	50
	Medio de cultivo (en μ l)	50	50	50	50
Serie 2:	Diluciones de la suspensión vírica:	-1	-2	-3	-4
	Suspensión vírica (en μ l)	50	50	50	50
	Antisuero PPR (en μ l)	50	50	50	50

(Nota: El antisuero PPR utilizado para este fin se prepara en cabras y se liofiliza. Se reconstituye con 1 ml de agua bidestilada estéril a una dilución 1/10.)

- d) Se incuban las mezclas a 37°C durante 1 hora.
- e) A cada pocillo se añaden 100 μ l de células suspendidas en medio de cultivo completo (30.000 células por pocillo).
- f) La microplaca se incuba a 37°C en presencia de CO₂.
- g) La placa se lee después de 7–10 días de incubación.

Por lo general, el ECP se presenta solo en los pocillos que contienen células infectadas con la mezcla de virus y medio de cultivo. Si este se detecta en los pocillos de la Serie 2, será necesario identificar el VPPR mediante la inmunofluorescencia, empleando un MAb frente a la PPR o mediante ELISA de inmunocaptura (utilizando el kit comercial existente). Si esta identificación confirma la presencia del VPPR, el antisuero frente a la PPR empleado debe haber sido demasiado débil o debe cambiarse el lote. Si la inmunofluorescencia o la inmunocaptura son negativas, o si al repetir la prueba con otro antisuero anti VPPR se obtiene el mismo resultado, debe haber un contaminante vírico, y el material en estudio debe destruirse.

iv) Producción de vacuna

Esta operación se realiza a mayor escala. Las células pueden infectarse con virus con una multiplicidad de infección como la de antes o con dosis altas, de hasta m.d.i. de 0,01. Los productos recogidos en diferentes tandas se juntan (para formar el producto final) tras dos ciclos de congelación-descongelación, y se guardan a -70°C, pendientes de los resultados de la titulación y de las pruebas de esterilidad. Si estos resultados son satisfactorios, la vacuna se liofiliza.

v) Liofilización

Se ha evaluado el uso de varios medios de liofilización para el VPPR. El medio de Weybridge es el más utilizado, y contiene hidrolizado de lactoalbúmina (LAH) al 2,5% (p/v), sacarosa al 5% (p/v) y glutamato sódico al 1% (p/v) en solución salina equilibrada de Hank (HBBS), a un pH de 7,2. Se ha comprobado una mejora considerable de la estabilidad a temperaturas superiores a los 4°C al emplear un medio de liofilización que contenga LAH al 5% (p/v) y sacarosa al 10% en HBBS (Mariner *et al.* 2017; Sarkar *et al.*, 2003) o que contenga Tris-HCl 20 mM a un pH de 7,4, EDTA 2 mM, Tween 80 al 0,02% (p/v) y trehalosa 1 M (al 34,2% (p/v)) (Silva *et al.*, 2011). Este medio de liofilización se añade a un volumen igual de la suspensión vírica (que puede haberse diluido de antemano para obtener el número deseado de dosis de vacuna por frasco). La mezcla resultante se conserva en frío, homogeneizada; a continuación se distribuye en frascos y se liofiliza. Al final de un ciclo de liofilización, se regula la sonda y se conserva a 35°C

durante 4 horas. Una vez completada la operación, los frascos se cierran al vacío. Se seleccionan muestras al azar (por ejemplo, un 5%) de este lote final y se someten a las pruebas de inocuidad, eficacia y esterilidad, y la humedad residual se estima según el método de Karl Fisher (óptimo $\leq 3,5\%$). Si estas pruebas dan resultados no satisfactorios, se destruye el lote completo.

2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

i) Células

Todas las cepas vacunales actuales del VPPR se cultivan en células Vero. Las células que se utilizan para la producción de vacuna contra la PPR deben estar libres de contaminación bacteriana, fúngica y vírica. Debe conocerse y documentarse el origen de estas células.

ii) Suero

El suero que se utiliza en el cultivo celular debe estar libre de virus extraños, especialmente de pestivirus. Se recomienda utilizar suero irradiado. El país de origen del suero deberá conocerse (debe evitarse el uso de suero procedente de países con riesgo alto de infecciones por encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET)).

iii) Medio de cultivo

El medio de cultivo tradicional es el medio mínimo esencial (MEM); estudios recientes han mostrado que el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con glucosa 25 mM o fructosa 25 mM aporta producciones de virus considerablemente superiores (diez veces más altas) (Silva *et al.*, 2011). El medio debe suplementarse con antibióticos (por ejemplo, penicilina + estreptomina a una concentración final de 100 UI [Unidades Internacionales]/ml y 100 µg/ml, respectivamente), y un agente antifúngico (por ejemplo, nistatina [Mycostatin] a una concentración final de 50 µg/ml). El medio se enriquece con suero fetal bovino al 10% (medio completo) para favorecer el crecimiento celular. Esta proporción de suero se reduce al 2% en el caso del medio de mantenimiento cuando la monocapa celular es completa.

2.2.3. Controles durante el proceso

Debe comprobarse que las células utilizadas en los cultivos celulares tengan aspecto normal y estén libres de virus contaminantes, especialmente del virus de la diarrea vírica bovina. Debe llevarse a cabo una titulación del virus del lote de inóculo empleando para ello medio sin suero y realizando una serie de diluciones decimales (0,5 ml virus + 4,5 ml diluyente) hasta 10^{-6} . Las células Vero de un frasco se tripsinizan y se resuspenden en un medio de cultivo completo a una concentración de 300.000/ml. Se distribuyen en una placa de 96 pocillos (a razón de 30.000 células por pocillo, equivalente a 100 µl de suspensión celular). A continuación, se añaden 100 µl de la dilución decimal del virus (diluciones que van des 10^{-2} a 10^{-6}) a las células. Para las células no infectadas se emplea como control una hilera de los pocillos, a la que se añade medio de cultivo sin virus (100 µl). La placa se incuba a 37°C en presencia de CO₂. La lectura de las placas se realiza 7-10 días después de la infección (comprobando si aparece ECP).

El título del virus se determina mediante el método de Spearman-Kärber.

2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad y pureza

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario se hallan en el capítulo 1.1.9.

Mediante cultivo, y después de la neutralización con un antisuero específico, debe comprobarse la identidad del contenido de cada recipiente procedente de cada lote envasado.

Debe analizarse y demostrarse que no está contaminado por bacterias, hongos ni otros virus. Estas pruebas se llevan a cabo con las células y los sueros antes de su utilización en la producción de la vacuna, en la reserva de inóculo y en la vacuna antes y después de la liofilización. Todo producto que no supere esta prueba se destruye.

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario se pueden encontrar en el capítulo 1.1.9.

ii) Seguridad y eficacia

Esta prueba se lleva a cabo en roedores con el fin de detectar toda posible toxicidad inespecífica asociada al producto, y también en las especies de destino, actualmente ovejas y cabras.

En cuanto a los roedores, se utilizan seis cobayas que pesen cada uno 200–250 g, y diez ratones no destetados (17–22 g, línea Swiss o similar). El contenido de la vacuna de cinco frascos se mezcla y se utiliza. Se inyectan 0,5 ml de la vacuna por vía intramuscular a una de las extremidades traseras de dos cobayas, 0,5 ml en la cavidad intraperitoneal de dos cobayas y 0,1 ml en la cavidad peritoneal de seis ratones. Dos cobayas y cuatro ratones se conservan como controles sin inocular. Los animales se observan durante 3 semanas. La prueba debe repetirse si muere un cobaya o dos ratones. Los animales muertos se someten a examen post-mortem con el fin de determinar la causa de su muerte. Al final de la tercera semana de observación, se sacrifican todos los animales para la realización de un examen post-mortem. Se registran todos los resultados. Se considera que la vacuna es satisfactoria si, durante la primera o segunda prueba, al menos el 80% de los animales continúa con buen estado de salud durante el período de observación y no se encuentran lesiones post-mortem significativas.

Normalmente, la dosis mínima inmunizante es de 100x la dosis más baja de virus vacunal capaz de inducir una respuesta inmunizante en un 50% de los casos. Por ejemplo, en el caso de la vacuna Nigeria 75/1 atenuada, el título mínimo requerido por dosis se ha comprobado que es de $10^{2.5}$ DICT₅₀.

Para la realización de esta prueba se requiere el siguiente material: la vacuna reconstituida con solución salina normal (los contenidos de cinco frascos mezclados) para producir 100 dosis y 0,1 dosis/ml; seis cabras y seis ovejas, que tengan todas 1 año de edad aproximadamente y estén libres de anticuerpos frente a la PPR; jeringas y agujas estériles y el VPPR patógeno, previamente titulado en cabras, diluido con solución salina normal estéril para obtener 10^3 dosis letal 50 para las cabras (DL₅₀).

Para la prueba de seguridad en el hospedador de destino, la vacuna contra la PPR debe reconstituirse con solución salina normal. El contenido combinado de cinco frascos se reconstituye en el diluyente para obtener soluciones de 100 dosis/ml y 0,1 dosis/ml. Se utilizan seis cabras y seis ovejas, todas de alrededor de 1 año de edad y libres de anticuerpos contra la PPR. Se vacunan dos cabras y dos ovejas por vía subcutánea con 100 dosis por animal; los animales restantes se mantienen como animales control que están en contacto con los vacunados. Los animales se someten a examen clínico diario durante 3 semanas y se lleva a cabo un registro de sus temperaturas rectales. Al final de este período, se toma sangre de todos los animales para preparar sueros. Todos los animales se exponen a una inyección subcutánea de 1 ml de la suspensión del VPPR patógeno que previamente se habrá comprobado que induce signos clínicos de la PPR en ovejas y en cabras. Durante dos semanas se observan los animales y diariamente se registran sus temperaturas corporales.

La vacuna se considera segura si no se observa ningún signo clínico anómalo en los animales vacunados, en concreto en aquellos que han recibido la dosis más alta.

Se demuestra que es eficaz si todos los animales vacunados resisten a la exposición mientras que los animales que meramente están en contacto con ellos permanecen susceptibles al virus al que se les expone.

iii) Potencia del lote

La potencia de cada lote debe determinarse mediante titulación del virus en cultivo celular y debe comprobarse que cumple los requisitos de dosis inmunizante mínima en la prueba de eficacia.

Se demuestra que la vacuna es potente si los animales vacunados con la dosis utilizada en la prueba de eficacia (véase arriba) desarrollan anticuerpos contra el VPPR cuando se analizan 3 semanas después de la vacunación mediante una prueba de neutralización vírica a una dilución del suero > 1/10. La titulación de anticuerpos neutralizantes se lleva a cabo como se describe en el apartado B.3.1, arriba.

Es posible que no se detecte seroconversión en algunos animales 3 semanas después de la vacunación, pero estos animales se resisten a desafiar si la vacuna es eficaz. La resistencia en estos casos se atribuye a la inmunidad mediada por células inducida por PPRV (Saravanan *et al.*, 2010).

2.3. Requisitos para la autorización

2.3.1. Requisitos de seguridad

- i) Seguridad en animales de destino y no de destino

La vacuna debe ser segura para su uso en todas las especies de animales de destino, incluidos los receptores de corta edad y las hembras gestantes.

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

Debe facilitarse información que indique que se han llevado a cabo estudios y que se ha comprobado que la cepa vacunal que se ha utilizado no ha revertido a la virulencia tras al menos tres pases inversos.

- iii) Consideraciones medioambientales

Los animales inoculados no deben vacunar contra la PPR.

2.3.2. Requisitos de eficacia

- i) Para la producción animal

En pruebas de campo o de otro tipo debe haberse demostrado que la vacuna atenuada contra la PPR es efectiva para su uso en todas las especies ovinas y caprinas, incluidos animales de corta edad y hembras gestantes.

- ii) Para el control y la erradicación

Las ovejas y cabras que se han recuperado de una infección por la PPR parecen quedar protegidas contra infecciones posteriores de por vida. Se hallaron anticuerpos neutralizantes contra el VPPR en ovejas y cabras hasta tres años después de la vacunación con una vacuna atenuada contra el VPPR preparada con la cepa Nigeria 75/1. Con otras vacunas atenuadas contra la PPR que se han desarrollado en la India también se ha observado una inmunidad duradera (Saravanan *et al.*, 2010a; Sen *et al.*, 2010). Todos estos datos indican que la PPR es una enfermedad que puede controlarse bien, e incluso erradicarse tras una campaña de vacunación a gran escala y bien planificada como la de la peste bovina.

2.3.3. Estabilidad

La vacuna liofilizada contra la PPR en el medio Weybridge puede guardarse durante al menos 2 años a 2–8°C (aunque es mejor guardarla a –20°C), con tal de que se guarde en vacío y protegida de la luz.

2.3.4. Vacunas que permiten una estrategia DIVA (detección de infección en animales vacunados)

Actualmente no se dispone de ninguna vacuna que permita la estrategia DIVA ni las pruebas relacionadas para ser utilizada en condiciones de campo.

2.3.5. Duración de la inmunidad

En todas las cepas vacunales debe determinarse la duración de la inmunidad protectora en pruebas con animales. En el caso de las vacunas con las cepas Nigeria 75/1 y Sungri/96, se ha comprobado que la inmunidad dura al menos 3 años (Saravanan *et al.*, 2010b; Zahur *et al.*, 2014). Por lo tanto, las preparaciones comerciales de estas vacunas deben ofrecer un mínimo de 3 años de protección.

3. Vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética

3.1. Vacunas de las que se dispone y sus ventajas

Los resultados provisionales sobre vacunas contra la PPR basadas en el virus recombinante de la viruela ovina y caprina indican que pueden proteger contra la viruela ovina y caprina y también contra la PPR (Berhe *et al.*, 2003; Caufour *et al.*, 2014; Diallo *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 2010). Todavía no se han validado para su uso en condiciones de campo. También se ha comprobado la efectividad de vacunas recientes desarrolladas basadas en adenovirus recombinantes (Herbert *et al.*, 2014; Holzer *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2012; Rojas *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013); este tipo de vacunas también ofrecen la posibilidad de una estrategia DIVA. Ninguna de ellas está todavía validada para su uso en condiciones de campo.

3.2. Requisitos especiales para las vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética, si los hay

Ninguno.

BIBLIOGRAFÍA

- ADOMBI C.M., LELENTA M., LAMIEN C.E., SHAMAKI D., YAO K., TRAORÉ A., SILBER R., COUACY-HYMAN E., BODJO C., DJAMAN J.A., LUCKINS A. & DIALLO A. (2011). Monkey CV1 cell line expressing the sheep-goat SLAM protein: a highly sensitive cell line for the isolation of peste des petits ruminants virus from pathological specimens. *J. Virol. Methods*, **173**, 306–313.
- ANDERSON J. & MCKAY J.A. (1994). The detection of antibodies against peste des petits ruminants virus in cattle, sheep and goats and the possible implication to rinderpest control programmes. *Epidemiol. Infect.*, **112**, 225–234.
- BANYARD A.C., PARIDA S., BATTEN C., OURA C., KWIATEK O. & LIBEAU G. (2010). Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control. *J. Gen. Virol.*, **91**, 2885–2897.
- BAO J., LI L., WANG Z., BARRETT T., SUO L., ZHAO W., LIU Y., LIU C. & LI J. (2008). Development of one-step real-time RT-PCR assay for detection and quantitation of peste des petits ruminants virus. *J. Virol. Methods*, **148**, 232–236.
- BARON J., FISHBOURNE E., COUACY-HYMAN E., ABUBAKAR M., JONES B.A., FROST L., HERBERT R., CHIBSSA T.R., VAN'T KLOOSTER G., AFZAL M., AYEBAZIBWE C., TOYE P., BASHIRUDDIN J. & BARON M.D. (2014). Development and testing of a field diagnostic assay for peste des petits ruminants virus. *Transbound. Emerg. Dis.*, **61**, 390–396.
- BATTEN C.A., BANYARD A.C., KING D.P., HENSTOCK M.R., EDWARDS L., SANDERS A., BUCZKOWSKI H., OURA C. A. L. & BARRETT T. (2011). A real-time PCR assay for the specific detection of peste des petits ruminants virus. *J. Virol. Methods*, **171**, 401–404.
- BERHE G., MINET C., LE GOFF C., BARRETT T., NGANGNOU A., GRILLET C., LIBEAU G., FLEMING M., BLACK D.N. & DIALLO A. (2003). Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste-des-petits-ruminants virus and capripoxvirus infections. *J. Virol.*, **77**, 1571–1577.
- CAUFOUR P., RUFAL T., LAMIEN C.E., LANCELOT R., KIDANE M., AWEL D., SERTSE T., KWIATEK O., LIBEAU G., SAHLE M., DIALLO A. & ALBINA E. (2014). Protective efficacy of a single immunization with capripoxvirus-vectored recombinant peste des petits ruminants vaccines in presence of pre-existing immunity. *Vaccine*, **32**, 3772–3779.
- CHEN W., HU S., QU L., HU Q., ZHANG Q., ZHI H., HUANG K. & BU Z. (2010). A goat poxvirus-vectored peste-des-petits-ruminants vaccine induces long-lasting neutralization antibody to high levels in goats and sheep. *Vaccine*, **28**, 4742–4750.
- COUACY-HYMAN E., HURARD C., GUILLOU J.P., LIBEAU G. & DIALLO A. (2002). Rapid and sensitive detection of peste des petits ruminants virus by a polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods*, **100**, 17–25.
- DIALLO A., MINET C., BERHE G., LE GOFF C., BLACK D.N., FLEMING M., BARRETT T., GRILLET C. & LIBEAU G. (2002). Goat immune response to capripox vaccine expressing the hemagglutinin protein of peste des petits ruminants. *Ann. NY Acad. Sci.*, **969**, 88–91.
- DIALLO A., TAYLOR W.P., LEFEVRE P.C. & PROVOST A. (1989). Atténuation d'une souche de virus de la peste des petits ruminants: candidat pour un vaccin homologue vivant. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **42**, 311–319.

- DUROJAIYE O.A. (1982). Precipitating antibody in sera of goats naturally affected with peste des petits ruminants. *Trop. Anim. Health Prod.*, **14**, 98–100.
- DUROJAIYE O.A., OBI T.U. & OJO O. (1983). Virological and serological diagnosis of peste des petits ruminants. *Trop. Vet.*, **1**, 13–17.
- FORSYTH M.A., PARIDA S., ALEXANDERSEN S., BELSHAM G.J. & BARRETT T. (2003). Rinderpest virus lineage differentiation using RT-PCR and SNAP-ELISA. *J. Virol. Methods*, **107**, 29–36.
- GARGADENNEC L. & LALANNE A. (1942). La peste des petits ruminants. *Bull. Serv. Zoo. A.O.F.*, **5**, 15–21.
- GEORGE A., DHAR P., SREENIVASA B.P., SINGH R.P. & BANDYOPAHYAY S.K. (2006). The M and N genes based simplex and multiplex PCRs are better than the F or H gene based simplex PCR for peste des petits ruminants virus. *Acta. Virol.*, **50**, 217–222.
- GIBBS E.P.J., TAYLOR W.P., LAWMAN M.J.P. & BRYANT J. (1979). Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus *Morbillivirus*. *Intervirology*, **11**, 268–274.
- HERBERT R., BARON J., BATTEN C., BARON M. & TAYLOR G. (2014). Recombinant adenovirus expressing the haemagglutinin of peste des petits ruminants virus (PPRV) protects goats against challenge with pathogenic virus; a DIVA vaccine for PPR. *Vet. Res.*, **45**, 24.
- HODGSON S., MOFFAT K., HILL H., FLANNERY J.T., GRAHAM S.P., BARON M.D. & DARPEL K.E. (2018). – Comparison of the immunogenicity and cross-lineage efficacy of live attenuated peste des petits ruminants virus vaccines PPRV/Nigeria/75/1 and PPRV/Sungri/96. *J. Virol.*, **92**, e01471-18 (in press).
- HOLZER B., TAYLOR G., RAJKO-NENOW P., HODGSON S., OKOTH E., HERBERT R., TOYE P. & BARON M.D. (2016). Determination of the minimum fully protective dose of adenovirus-based DIVA vaccine against peste des petits ruminants virus challenge in East African goats. *Vet. Res.*, **47**, 20.
- KWIATEK O., KEITA D., GIL P., FERNANDEZ-PINERO J., JIMENEZ CLAVERO M.A., ALBINA E. & LIBEAU G. (2010). Quantitative one-step real-time RT-PCR for the fast detection of the four genotypes of PPRV. *J. Virol. Methods*, **165**, 168–177.
- LEFEVRE P.C. & DIALLO A. (1990). Peste des petits ruminants. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **9**, 951–965.
- LI L., BAO J., WU X., WANG Z., WANG J., GONG M., LIU C. & LI J. (2010). Rapid detection of peste des petits ruminants virus by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Virol. Methods*, **170**, 37–41.
- LI L., WU X., LIU F., WANG Z., LIU C., WANG Q. & BAO J. (2016). Rapid detection of lineage IV peste des petits ruminants virus by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods*, **235**, 131–133. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.05.019. Epub 2016 Jun 1.
- LIBEAU G., DIALLO A., COLAS F. & GUERRE L. (1994). Rapid differential diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using an immunocapture ELISA. *Vet. Rec.*, **134**, 300–304.
- LIBEAU G., PREHAUD C., LANCELOT R., COLAS F., GUERRE L., BISHOP D.H.L. & DIALLO A. (1995). Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein. *Res. Vet. Sci.*, **58**, 50–55.
- MAJIYAGBE K.A., NAWATHE D.R. & ABEGUNDE A. (1984). Rapid diagnosis of PPR infection, application of immunoelectro-osmophoresis (IEOP) technique. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **37**, 11–15.
- MARINER J.C., GACHANJA J., TINDIH S.H. & TOYE P. (2017). A thermostable presentation of the live, attenuated peste des petits ruminants vaccine in use in Africa and Asia. *Vaccine*, **35**, 3773–3779.
- QIN J., HUANG H., RUAN Y., HOU X., YANG S., WANG C., HUANG G., WANG T., FENG N., GAO Y. & XIA X. (2012). A novel recombinant Peste des petits ruminants-canine adenovirus vaccine elicits long-lasting neutralizing antibody response against PPR in goats. *PLoS ONE*, **7**, e37170.
- ROJAS J.M., MORENO H., VALCARCEL F., PENA L., SEVILLA N. & MARTIN V. (2014). Vaccination with recombinant adenoviruses expressing the peste des petits ruminants virus F or H proteins overcomes viral immunosuppression and induces protective immunity against PPRV challenge in sheep. *PLoS ONE*, **9**, e101226.

SALIKI J.T., LIBEAU G., HOUSE J.A., MEBUS C.A. & DUBOVI E.J. (1993). Monoclonal antibody-based blocking enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection and titration of peste-des-petits ruminants virus antibody in caprine and ovine sera. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 1075–1082.

SARAVANAN P., SEN A., BALAMURUGAN V., RAJAK K.K., BHANUPRAKASH V., PALANISWAMI K.S., NACHIMUTHU K., THANGAVELU A., DHINAKARRAJ G., HEGDE R. & SINGH R.K. (2010a). Comparative efficacy of peste des petits ruminants (PPR) vaccines. *Biologicals*, **38**, 479–485.

SARAVANAN P., BALAMURUGAN V., SEN A., SREENIVASA B.P., SINGH R.P., BANDYOPADHYAY S.K. & SINGH, R.K. (2010 b). Immune response of goats to a Vero cell adapted live attenuated homologous PPR vaccine. *Indian Vet. J.* **87**, 1–3.

SARAVANAN P., SINGH R.P., BALAMURUGAN V., DHAR P., SREENIVASA B.P., MUTHUCHELVAN D., SEN A., ALEYS A.G., SINGH R.K. & BANDYOPADHYAY S.K. (2004). Development of an N gene-based PCR-ELISA for detection of Peste-des-petits-ruminants virus in clinical samples. *Acta Virol.*, **48**, 249–255.

SARKAR J., SREENIVASA B.P., SINGH R.P., DHAR P. & BANDYOPADHYAY S.K. (2003). Comparative efficacy of various chemical stabilizers on the thermostability of a live-attenuated peste des petits ruminants (PPR) vaccine. *Vaccine*, **21**, 4728–4735.

SEN A., SARAVANAN P., BALAMURUGAN V., RAJAK K. K., SUDHAKAR S. B., BHANUPRAKASH V., PARIDA S. & SINGH R. K. (2010). Vaccines against peste des petits ruminants virus. *Expert Rev. Vaccines*, **9**, 785–796.

SILVA A.C., CARRONDO M.J. & ALVES P.M. (2011). Strategies for improved stability of peste des petits ruminants vaccine. *Vaccine*, **29**, 4983–4991.

SINGH R.P., SREENIVASA B.P., DHAR P. & BANDYOPADHYAY S.K. (2004). A sandwich-ELISA for the diagnosis of Peste des petits ruminants (PPR) infection in small ruminants using anti-nucleocapsid protein monoclonal antibody. *Arch. Virol.*, **149**, 2155–2170.

WANG Y., LIU G., CHEN Z., LI C., SHI L., LI W., HUANG H., TAO C., CHENG C., XU B. & LI G. (2013). Recombinant adenovirus expressing F and H fusion proteins of peste des petits ruminants virus induces both humoral and cell-mediated immune responses in goats. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **154**, 1–7.

ZAHUR A.B., IRSHAD H., ULLAH A., AFZAL M., LATIF A., ULLAH R.W., FAROOQ U., SAMO M.H., FERRARI M.J., HUSSAIN, M. & AHMAD M.M. (2014). Peste des Petits Ruminants Vaccine (Nigerian Strain 75/1) Confers Protection for at Least 3 Years in Sheep and Goats. *J. Biosci. Med.*, **2**, 27–33.

*

* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Peste de los pequeños rumiantes (puede consultarse la lista más actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>). Para más información sobre pruebas de diagnóstico, reactivos y vacunas para la Peste de los pequeños rumiantes, por favor contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2019.