

## PERINEUMONÍA CONTAGIOSA BOVINA (INFECCIÓN POR *MYCOPLASMA MYCOIDES* SUBSP. *MYCOIDES*)<sup>1</sup>

---

### RESUMEN

La perineumonía contagiosa bovina (PCB) es una enfermedad de los rumiantes (géneros *Bos* y *Bubalus*) causada por *Mycoplasma mycoides* subesp. *mycoides* (Mmm). Se manifiesta en el ganado bovino con anorexia, fiebre y signos respiratorios como disnea, polipnea, tos y rinorrea. El diagnóstico definitivo requiere del aislamiento o la detección del agente etiológico. Los principales problemas para el control o la erradicación son la presencia frecuente de infecciones subagudas o asintomáticas y la persistencia de los portadores crónicos después de la fase clínica y la falta de una cobertura vacunal amplia.

**Detección del agente:** Las muestras que hay que tomar de los animales vivos incluyen hisopos nasales y/o lavados broncoalveolares, o líquido pleural obtenido por punción. Entre las muestras que se han de tomar en las necropsias se incluye el material de las lesiones pulmonares, los ganglios linfáticos, líquido pleural y líquido sinovial de los animales con artritis.

Para el cultivo del agente patógeno, se homogeneizan los tejidos en solución tamponada y se inoculan en caldos y medios de cultivo sólidos selectivos con antibiótico u otros inhibidores para evitar el crecimiento de bacterias con pared celular. El crecimiento de Mmm puede tardar un máximo de 10 días, en función del tipo de muestra y del título de micoplasma.

En caldo de cultivo, el crecimiento se observa como una turbidez homogénea que forma remolinos cuando se agita; en medio sólido, aparecen pequeñas colonias, de 1 mm de diámetro, con la clásica morfología de "huevo frito". Las características bioquímicas de Mmm son: sensibilidad a la digitonina, reducción de las sales de tetrazolio, fermentación de la glucosa, ausencia de arginina hidrolasa, ausencia o cantidad muy escasa de fosfatasa, y ausencia de actividades proteolíticas. Se han descrito medios especiales que se recomiendan para estas pruebas. El diagnóstico se puede confirmar mediante pruebas inmunológicas, como la prueba de inhibición del crecimiento y la prueba de inmunofluorescencia (en ambas se utilizan sueros hiperinmunes). La reacción en cadena de la polimerasa se utiliza por ser una prueba rápida, específica, sensible y fácil de utilizar.

**Pruebas serológicas:** La prueba de fijación del complemento de Campbell & Turner modificada, continúa siendo la prueba más idónea para certificar animales individuales antes de su traslado, incluso para el comercio internacional. El enzimoimmunoanálisis es también una prueba adecuada para certificar animales individuales antes del movimiento. Se ha evaluado una prueba de inmunotransferencia y es muy específica y sensible.

**Requisitos para las vacunas:** Para la producción de las vacunas se recomiendan las cepas atenuadas T1/44 y T1sr. El título mínimo requerido es de  $10^7$  micoplasmas por dosis de vacuna, pero se recomiendan títulos más altos, de al menos  $10^8$  micoplasmas.

### A. INTRODUCCIÓN

La perineumonía contagiosa bovina (PCB) es una enfermedad respiratoria infecciosa y contagiosa que afecta a animales de la familia *Bovidae* y que está causada por *Mycoplasma mycoides* subesp. *mycoides* (Mmm), con

---

<sup>1</sup> Tras la modificación taxonómica del cluster *Mycoplasma mycoides* realizada por Manso-Silvan *et al.*, 2009, las designaciones "Colonia Pequeña (SC)" y Colonia Grande (LC) han dejado de utilizarse.

una gran repercusión en la producción pecuaria y posibilidad de propagación rápida. Como consecuencia, los países infectados por la PCB están excluidos del comercio internacional de animales vivos.

*Mmm* es un micoplasma, es decir, una bacteria sin pared (clase taxonómica *Mollicutes*), perteneciente al denominado “grupo micoide”, que engloba cinco especies de micoplasmas que resultan patógenas en los rumiantes (Manso-Silván *et al.*, 2009). Estos cinco micoplasmas tienen en común características fenotípicas y genotípicas que causan reacciones cruzadas en técnicas de diagnóstico convencionales. El micoplasma más estrechamente relacionado con *Mmm* es *M. mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*), que suelen hallarse en cabras.

En condiciones naturales, *Mmm* sólo afecta a los rumiantes del género *Bos*, es decir, principalmente al ganado bovino y los cebúes, pero también al yak (*Bos grunniens*) y a los búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) (Santini *et al.*, 1992). *Mmm* se ha aislado de ovejas y cabras en África, en Portugal y en India (Srivastava *et al.*, 2000). Entre los animales salvajes se ha descrito un único caso en los búfalos americanos (*Bison bison*) y ninguno en los búfalos africanos (*Syncerus caffer*) u otros rumiantes salvajes. Los pequeños rumiantes y los animales salvajes no desempeñan ningún papel en la epidemiología de la enfermedad, y la PCB no es un agente zoonótico.

El periodo de incubación en animales que resultan infectados de forma natural puede oscilar entre las 3 semanas y los 6 meses. Los signos clínicos en el ganado bovino incluyen desde una forma hiperaguda a una forma aguda, subaguda y crónica.

La PCB se manifiesta con anorexia, fiebre y signos respiratorios, como disnea, polipnea, tos y rinorrea durante la fase aguda de la enfermedad, momento en que el agente causal se puede transmitir rápidamente; en la fase crónica, el agente puede persistir a largo plazo. Las lesiones características son una neumonía unilateral asociada a pleuresía. Durante la fase crónica de la enfermedad, los signos clínicos menguan y los animales infectados son más difíciles de detectar. En estos casos, los pulmones pueden contener las características lesiones encapsuladas, denominadas secuestros. Estos animales, portadores “silentes”, pueden ser infecciosos y, por lo tanto, responsables de la persistencia desapercibida de la infección en un rebaño; pueden desempeñar un papel importante en el mantenimiento y en la epidemiología de la enfermedad.

La PCB se ha identificado de manera inequívoca en Europa desde el siglo XVIII, y empezó a tener una distribución mundial durante la segunda mitad del siglo XIX, debido al comercio de ganado bovino. La PCR se erradicó de muchos países a principios del siglo XX, principalmente mediante estrategias de sacrificio sanitario (Reino Unido, EE.UU.) o con campañas de vacunación seguidas del sacrificio sanitario (Australia). Hoy en día, la PCB sigue siendo enzoótica en muchos países africanos subsaharianos, mientras que en Europa los últimos casos de PCB se observaron en Portugal en 1999. En algunos países asiáticos, la situación no está clara. En la interfaz WAHIS<sup>2</sup> de la OIE se puede consultar la situación actual de la enfermedad.

En condiciones de campo, la PCB podría confundirse con otras enfermedades que causan problemas respiratorios, como la pasteurelosis u otras micoplasmosis. La ausencia de un diagnóstico confirmativo podría dar lugar al uso de tratamientos antibióticos en el caso de brotes de PCB.

No existe riesgo conocido de infección por *Mmm* en el ser humano. Las medidas de biocontención deben determinarse a partir de un análisis del riesgo, como se describe en 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*. En las zonas libres de PCB, es aconsejable manipular *Mmm* en laboratorios que cuenten con un nivel 2 de bioseguridad (BSL), mientras que el BSL1 sería suficiente en las zonas enzoóticas. En todos los procedimientos deben aplicarse buenas prácticas de laboratorio.

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico clínico de la PCB no es fiable porque inicialmente podría no haber signos, o ser leves, de tal modo que tal vez no pueda distinguirse de una neumonía grave cualquiera. Por lo tanto, la PCB debe estudiarse por métodos de diagnóstico anatomopatológicos, microbiológicos, moleculares o serológicos. Dado que las lesiones anatomopatológicas de la PCB se están claramente definidas y son patognomónicas, la vigilancia de la PCB en el matadero mediante el examen pulmonar es un método práctico de seguimiento de la enfermedad.

Para confirmar un brote siempre se recomienda aislar e identificar el microorganismo causal. En la Tabla 1 se detallan los métodos de laboratorio que se utilizan para diagnosticar la PCB.

---

2 <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/the-world-animal-health-information-system/the-world-animal-health-information-system/>

**Tabla 1.** Métodos de laboratorio que se utilizan actualmente para el diagnóstico de la PCB y su propósito

Método	Propósito					
	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<sup>3</sup></b>						
Aislamiento por cultivo <i>in-vitro</i> (seguido de pruebas de identificación a nivel de especie)	+	–	–	+++	–	–
Prueba molecular directa (PCR)	–	–	–	++	–	–
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
CF	+++	++	+++	++	+++	–
Inmuno-transferencia	++	++	++	++	++	–
C-ELISA	+++	++	+++	++	+++	–

\*NB: Actualmente, no existe ninguna prueba descrita en la tabla que permita evaluar el estado inmunitario respecto a la enfermedad en animales vacunados con las cepas T1 actuales.

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones;

+ = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; CF = fijación del complemento;

C-ELISA = enzimoimmunoanálisis de competición.

## 1. Detección del agente

### 1.1. Muestras

Una de las claves para que el aislamiento funcione es obtener muestras de sangre de calidad. *Mmm* se puede aislar a partir de muestras de animales vivos o de material procedente de una necropsia. Las muestras de animales vivos son hisopos o secreciones nasales, lavados broncoalveolares o transtraqueales y líquido pleural tomado asépticamente por punción en la parte baja de la cavidad torácica, entre la séptima y octava costillas. Las muestras de una necropsia son los pulmones con lesiones, el líquido pleural ("linfa"), los ganglios linfáticos del tracto broncopulmonar y el líquido sinovial de los animales con artritis. Las muestras de pulmón deben tomarse de las lesiones situadas en interfase entre el tejido enfermo y el normal.

Cuando se obtienen hisopos nasales, debe utilizarse un medio para el transporte que proteja los micoplasmas y evite la multiplicación de bacterias y hongos con pared celular (caldo de infusión de corazón sin peptona y glucosa, 10% de extracto de levadura, 20% de suero tratado con calor (equino o porcino), 0,3% de agar, 500 Unidades Internacionales [IU]/ml de penicilina y 0,2 g/l de acetato de talio).

Una vez obtenidas, todas las muestras se mantienen refrigeradas a 4°C y se envían al laboratorio en un plazo máximo de 24 horas. Si se va a tardar más en enviarlas, deben congelarse a –20°C o menos.

3 Se recomienda una combinación de métodos de identificación del agente en la misma muestra clínica.

## 1.2. Cultivo *in-vitro*

La presencia del agente patógeno varía en gran medida según la fase de desarrollo de las lesiones, y un resultado negativo no es concluyente, sobre todo si el animal ha sido tratado con antibiótico.

*Mmm* necesita medios selectivos para crecer, pero no se considera un micoplasma exigente. Existen varias composiciones de medio de cultivo que se utilizan en distintos laboratorios pero, básicamente, deben contener: un caldo de cultivo básico (como la infusión corazón) o el caldo PPLO (microorganismos semejantes a los de la perineumonía), 1–2,5 % de extracto de levadura, un 10–20% de suero inactivado de caballo, un 0,1% de glucosa, un 1% de triptosa y un 0,0024% de ADN. Para evitar el crecimiento de otras bacterias, los medios también pueden contener un antibiótico de la familia de las penicilinas (por ejemplo, 500 UI/ml de penicilina G), porque los micoplasmas son resistentes por naturaleza. Los medios deben utilizarse tanto en forma de caldo como sólidos. Todos los medios de cultivo que se preparan deben someterse a un control de calidad y deben demostrar que permiten el crecimiento de *Mycoplasma* spp. a bajo número de pasas a partir de inóculos pequeños. La cepa de referencia se debe cultivar en paralelo con las muestras sospechosas para asegurar que las pruebas se llevan a cabo correctamente.

Tras triturar las muestras de tejido con caldo de cultivo, se diluyen diez veces para reducir la contaminación bacteriana y se inoculan en cinco tubos de caldo y en cinco placas de medios sólidos. Para evitar la contaminación bacteriana y para reducir el número de tubos y placas por muestra, el sobrenadante de la muestra triturada se puede filtrar por un filtro de 25 mm con un tamaño de poro de 0,45. El líquido pleural se puede inocular directamente sin una dilución ni filtración previa puesto que, cuando está infectado, es casi un cultivo puro de *Mmm*. Para asegurar las mejores condiciones de crecimiento de los micoplasmas, se incuban los tubos y las placas a 37°C en una atmósfera que contenga un 5% de CO<sub>2</sub>, y se inspeccionan a diario durante un máximo de 10 días. Transcurrido este tiempo, si no hay crecimiento, la muestra se considera negativa. Las muestras positivas en medio líquido presentan una turbidez homogénea, normalmente en un plazo de 2–4 días, a menudo con un filamento frágil y sedoso llamado “cometa”. Durante los siguientes días aparece una opacidad uniforme que forma remolinos cuando se agita. En medio sólido, las colonias son pequeñas (1 mm de diámetro) y presentan la forma clásica de “huevo frito” con un centro denso. En esta fase, pueden aplicarse las pruebas bioquímicas, la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFA) o la reacción en cadena de la polimerasa PCR para identificar las colonias.

## 1.3. Pruebas de identificación bioquímicas e inmunológicas

En el pasado, lo habitual era utilizar pruebas bioquímicas, pero hoy en día se han ido sustituyendo por otras, concretamente la PCR. Las pruebas bioquímicas por sí solas no permiten identificar un *Mycoplasma* a nivel de especie, debido al solapamiento de los pocos rasgos fenotípicos que se pueden evaluar. Por lo tanto, para identificar las cepas aisladas se recomiendan pruebas moleculares como la PCR. Los métodos bioquímicos se indican a continuación por interés histórico.

Tras el subcultivo, se deben eliminar del medio los antibióticos, para comprobar si la cepa es un micoplasma o una forma-L de una bacteria que recuperará su forma original en el medio sin inhibidores. Una vez realizada esta prueba, se puede identificar el microorganismo utilizando pruebas bioquímicas (Freundt *et al.*, 1979)

*Mmm* necesita colesterol para crecer y, por lo tanto, es sensible a la digitonina (como todos los miembros del orden Mycoplasmatales), no produce “velo y manchas”, fermenta la glucosa, reduce las sales de tetrazolio (aeróbica y anaeróticamente), no hidroliza la arginina, carece de actividad fosfatasa y no tiene actividad proteolítica, o esta es muy débil.

Se han desarrollado medios especiales para estas pruebas que contienen los mismos ingredientes básicos (caldo de infusión de corazón o caldo Bacto PPLO, suero de caballo, 25% de solución de extracto de levadura, 0,2% de solución de ADN), a los que se añade un 1% de una solución de glucosa al 50% para comprobar la hidrólisis de glucosa, un 4% de una solución de arginina-HCl al 38% para comprobar la hidrólisis de arginina, y un 1% de una solución de cloruro de dimetil tetrazolio para comprobar la reducción del tetrazolio, más un indicador de pH (por ejemplo, rojo fenol). (NOTA: no debe añadirse indicador de pH a un medio que contenga cloruro de trifeniltetrazolio). Para la demostración de proteólisis, se realiza el cultivo en agar caseína y/o agar con suero coagulado.

Una vez comprobadas las características bioquímicas, se debe realizar una de las siguientes pruebas inmunológicas para confirmar la identificación: prueba de inhibición del crecimiento en disco (DGIT) (Freundt *et al.*, 1979), inmunofluorescencia (FAT), IFA, prueba de inmunodifusión en gel de agar

(AGID) (Provost, 1972), o prueba de inmunounión en punto sobre un filtro de membrana (MF-dot) test (Brocchi *et al.*, 1993).

Actualmente, pocos laboratorios utilizan pruebas inmunoquímicas para la identificación rutinaria de *Mmm* debido a la aparición de la PCR, que es más específica, sensible, rápida y fácil de realizar y de estandarizar.

#### 1.4. Métodos moleculares de identificación y tipificación – pruebas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para más detalles sobre la implementación y validación de las pruebas basadas en la PCR, véase el Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*.

La PCR se ha convertido en el método de elección para la identificación rápida y específica de *Mmm* cuando el microorganismo se aísla de una muestra clínica. Para evitar la contaminación cruzada y la contaminación por restos de pruebas anteriores, es precisa una separación estricta de las salas del laboratorio que se utilicen para preparar la PCR y para manipular las reacciones. Distintos autores han desarrollado un sistema de PCR para la identificación de *Mmm*, y no existe ninguno de elección, aunque la PCR anidada más sensible debe evitarse porque implica un riesgo más alto de arrastre de producto de la PCR, que podría dar lugar a falsos positivos. Dado que la diana de ADN no se busca en la totalidad de la muestra, donde el número de células varía y donde puede haber inhibidores de la PCR, sino en una cepa, la sensibilidad no es un punto crítico. Distintos autores han diseñado cebadores complementarios a las regiones de ADN CAP-21, el gen *lppA* y el gen de ARN de la región 16S del genoma de *Mmm*, y se han utilizado en sistemas de PCR, seguidos de un análisis del producto amplificado (amplión) mediante endonucleasas de restricción (PCR-REA) o mediante una segunda amplificación (PCR anidada) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Sistemas de PCR convencional para la identificación de *Mmm*

Región de AND diana*	Amplión (pb)	Enzima de restricción	Productos de la hidrólisis (pb)	Especificidad	Referencia
CAP-21 (posición: 181628)	574	<i>AsnI</i>	379, 178 220, 178, 153	<i>Mmm</i> <i>Mmc</i>	Bashiruddin <i>et al.</i> , 1994
(posición: 443115)	275	<i>AseI</i>	232, 43	<i>Mmm</i>	Dedieu <i>et al.</i> , 1994**
Gen <i>lppA</i> (anidada)	717	–		<i>Mmm</i>	Miserez <i>et al.</i> , 1997***
(posición: 20061)	503				

\*Número de acceso a Gene Bank de la secuencia PG1 de *Mmm*: NC005364

\*\*Secuencias de cebadores: MSC1: ATA-CTT-CTG-TTC-TAG-TAA-TAT-G; MSC2: CTG-ATT-ATG-ATG-ACA-GTG-GTC-A

\*\*\* Secuencias de cebadores: SC3NEST1-L: ACA-AAA-AGA-AGA-TAT-GGT-GTT-GG y SC3NEST1-R: ATC-AGG-TTT-ATC-CAT-TGG-TTG-G; SC3VII: ATT-AGG-ATT-AGC-TGG-TGG-AGG-AAC y SC3IV-S: TCT-GGG-TTA-TTC-GAA-CCA-TTA-T

Como ejemplo de un sistema de PCR que se utiliza de forma rutinaria para la identificación de *Mmm*, se proporciona a continuación el procedimiento de PCR-REA adaptado de Bashiruddin *et al.*, 1994.

##### 1.4.1. Extracción de ADN

Cualquier método aceptado de extracción de ADN sería adecuado. Un método sencillo y efectivo consiste en escoger una única colonia, volver a suspenderla en 100 µl de agua de grado PCR, hervirla durante 15 minutos para lisar las células y liberar el ADN, y centrifugarla a 8000 **g** durante 1 minuto. El sobrenadante con el ADN se utilizará en la PCR tras una dilución a 1/10 en agua de grado PCR. Como alternativa, se centrifugan a 8000 **g** durante 1 minuto 500 µl de un caldo de cultivo de 4 días, de una sola colonia; el precipitado se vuelve a suspender en 100 µl de agua de grado PCR, y se hierve y centrifuga como antes. Tras la dilución a 1/10, se utiliza 1 µl del sobrenadante como molde para la PCR.

### 1.4.2. Amplificación mediante PCR

i) Preparación de la mezcla primaria

Los oligonucleótidos sintéticos deben disolverse en tampón TE (Tris-EDTA [ácido etilendiaminotetraacético]) hasta una concentración de 100 µM. Esta solución primaria es estable a -20°C durante al menos 4 años. Se prepara una solución de trabajo a partir de la solución primaria mediante una dilución a ½, para obtener una concentración final de 50 µM. En un volumen final de 25 µl, la mezcla para PCR debe contener lo siguiente:

	Concentración	Volumen para una reacción (volumen total de 25 µl)	Concentración final en la mezcla de reacción
H <sub>2</sub> O de grado PCR	–	16 µl	–
Tampón de reacción sin MgCl <sub>2</sub>	10 x	2.5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 µl	3 mM
dNTP	10 mM	1 µl	400 µM
Cebador MM450*	50 µM	0.5 µl	1 µM
Cebador MM451**	50 µM	0.5 µl	1 µM
Pol. Taq	5U/µl	0.5 µl	2.5 U
ADN molde	1 µl		

\*Secuencia: 5'-GTA-TTT-TCC-TTT-CTA-ATT-TG-3'

\*\* Secuencia: 5'-AAA-TCA-AAT-TAA-TAA-GTT-TG-3'

ii) Condiciones de amplificación

Se añade a la mezcla 1 µl de ADN molde de la muestra analizada, o control positivo (ADN de cepa PG1 de tipo *Mmm*) o control negativo (agua). La amplificación se lleva a cabo en las siguientes condiciones: 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos; y se mantiene a 4°C indefinidamente.

iii) Detección de productos amplificados

Tras la amplificación, las reacciones deben abrirse en una sala independiente, donde los productos de la PCR se detectan mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% durante 2 horas a 90 V. Las reacciones positivas y el control positivo, y no el control negativo, deben presentar un amplicón de 574 pb visible con luz UV tras la tinción con un colorante fluorescente adecuado.

### 1.4.3. Análisis por endonucleasas de restricción (REA)

Se lleva a cabo una restricción enzimática del producto de la PCR en un volumen de reacción de 10 µl que contenga: 2 µl de mezcla para PCR, 5 U de *AsnI* (2 µl), tampón 1x, a 37°C durante 1 hora. El resultado se analiza en una electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 1 hora a 100 V y los productos se visualizan como en el caso anterior.

La identificación se basa en los tamaños de los productos de restricción, como se muestra en la Tabla 2.

NB: La detección directa y la identificación de *Mmm* mediante PCR en muestras clínicas todavía no se ha evaluado del todo y, por lo tanto, la PCR convencional podría ser inadecuada debido a la presencia de inhibidores de la PCR, menos microorganismos en la muestra y la presencia de otras bacterias, con una reducción paralela en la sensibilidad y la especificidad. Estos problemas deben evitarse utilizando pruebas de PCR en tiempo real para detectar *Mmm*, ya que la fluorescencia resultante de una amplificación genómica específica se detecta y mide a medida que se está sintetizando el amplicón, y se obtiene un aumento de 2–3 log en la sensibilidad respecto a la PCR convencional (Lorenzon *et al.*, 2008). Empleando muestras como el líquido pleural, la PCR puede realizarse tras hervir la muestra y centrifugar para recuperar ADN en el sobrenadante. En el caso de fragmentos de pulmón, la PCR se aplica después de los procedimientos de extracción de ADN empleando un kit de extracción o una extracción con fenol/cloroformo.

#### 1.4.4. Tipificación de la cepa de *Mmm*

La secuenciación del ADN ha resultado muy ventajosa para la tipificación de las cepas de *Mmm*. En la actualidad, se dispone de varios genomas de *Mmm* que pueden adquirirse en línea (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=656088>). No obstante, la comparación entre genomas completos de distintas cepas de *Mmm* no es sencilla debido a la existencia de múltiples reestructuraciones de los genomas o a inserciones de ADN. Para superar este problema sin perder la sensibilidad en la diferenciación entre cepas, se ha desarrollado un método de tipificación multilocus de secuencias (MLST) que permite identificación de cepa, análisis filogenético y datación molecular (Dupuy *et al.*, 2012).

## 2. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas para la PCB no deben realizarse individualmente sino en grupos de animales del mismo rebaño región, puesto que en animales individuales pueden producirse falsos positivos o falsos negativos. Las pruebas individuales con animales pueden resultar engañosas, porque el animal se encuentre en las primeras fases de la enfermedad, que pueden durar varios meses, antes de que se produzcan los anticuerpos específicos, o porque esté en la fase crónica de la enfermedad, cuando muy pocos animales son seropositivos. Pueden tener lugar falsos positivos (2%), una causa importante de los cuales son las reacciones serológicas cruzadas con otros micoplasmas, en particular otros miembros del grupo *M. mycoides*. La validez de los resultados debe confirmarse mediante un examen post-mortem y bacteriológico, y pruebas serológicas con sangre obtenida en el momento del sacrificio.

La prueba de la fijación del complemento (CF) y los enzimoimmunoanálisis (ELISA) se recomiendan para los programas de cribado y de erradicación. La inmunotransferencia altamente específica es útil como prueba confirmativa, pero no es adecuada para el cribado masivo.

### 2.1. Fijación del complemento (prueba recomendada para determinar la ausencia de enfermedad)

La CF de Campbell y Turner modificada continúa siendo el procedimiento recomendado y se utiliza mucho en todos los países donde se presenta la infección (Provost *et al.*, 1987). La prueba de FC se lleva a cabo más cómodamente en un formato de microtitulación y se ha homologado a nivel de los países de la Unión Europea (Comisión Europea, 2001).

Con una sensibilidad del 63,8% y una especificidad del 98% (Bellini *et al.*, 1998), la CF permite detectar casi todos los animales enfermos con lesiones agudas, pero una proporción bastante más baja de animales en las fases iniciales de la enfermedad o de animales con lesiones crónicas.

#### 2.1.1. Reactivos

Para validar y acreditar la CF, son fundamentales el control de calidad y la estandarización de todos los reactivos, además de las pipetas y las puntas que se utilicen para dispensarlos. Para facilitar el procedimiento de acreditación (ISO/IEC<sup>4</sup> 17025), pueden obtenerse los antígenos y sueros control apropiados en los Laboratorios de Referencia de la OIE para la PCB.

Las características de los siguientes reactivos deben tenerse en cuenta, porque repercuten en el resultado final.

- i) Agua esterilizada bidestilada. La calidad del agua es fundamental para el desarrollo de la reacción.
- ii) *Sueros de referencia positivos*: En los Laboratorios de Referencia de la OIE de Portugal y de Italia se dispone de un suero de referencia positivo (PRS) bovino para la armonización, que debe utilizarse en el laboratorio de diagnóstico para el uso rutinario y para la titulación de antígeno. El PRS se ha obtenido de ganado bovino infectado de forma natural por la PCB, y es negativo contra *Brucella*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Chlamydia*, *Coxiella burnetii*, *Leptospira*, el virus de la diarrea viral bovina, el virus sincitial respiratorio, el virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa, adenovirus, el herpesvirus bovino tipo 4, el virus de la fiebre aftosa, el virus de la leucosis bovina y el virus de la parainfluenza tipo 3, y también debe ser negativo para otros virus accidentales o inesperados. El PRS presenta un 0% de hemólisis en una dilución a 1/160 y un 50% de hemólisis en una dilución a 1/320. El PRS debe almacenarse a –20°C en alícuotas, ya que ello impide las congelaciones-descongelaciones retiradas, que dan lugar a un deterioro del suero.

---

4 ISO/IEC: Organización Internacional de Normalización/Comisión Electrotécnica Internacional

- iii) *Sueros de referencia negativos*: el suero control negativo (PRS), también disponible en los Laboratorios de Referencia de la OIE de Portugal y de Italia, es un suero de ganado bovino sano procedente de una fuente libre de encefalopatía espongiiforme bovina (EEB). Está libre de PCB y debe ser negativo contra los microorganismos mencionados en el apartado anterior. El PRS debe almacenarse en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- iv) *Antígeno*: En la prueba debe utilizarse un antígeno que haya sido preparado a partir de una suspensión de una cepa de *Mmm* seleccionada previamente y analizada, y que presente las cinco bandas antigénicas específicas de 110, 98, 95, 62/60 y 48 kDa. El antígeno se ha titulado previamente en tablero de ajedrez y se ha utilizado a una dosis de 2 unidades fijadoras del complemento (CFU), y debe estar estandarizado para dar un 50% de fijación a una dilución de 1/320 de PRS. Debe almacenarse a  $4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  y no puede congelarse. Se produce, estandariza y entrega en los Laboratorios de Referencia de la OIE. El uso de un antígeno estandarizado contra sueros de referencia de la OIE promueve la armonización internacional de las pruebas de diagnóstico.
- v) *Tampón*: la solución salina tamponada con veronal (VB),  $\text{pH } 7,2 \pm 1$ , es el diluyente estándar para la CF. La VB puede prepararse a partir de comprimidos comerciales o bien a partir de una solución primaria de cloruro de sodio (42,5 g), ácido barbitúrico (2,875 g), dietilbarbiturato de sodio (1,875 g), cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O} - 0,501 \text{ g}$ ), y cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O} - 0,18 \text{ g}$ ) en 1 litro de agua destilada. Se utiliza una solución primaria concentrada diluida a 1/5 en agua doblemente destilada, antes del uso.
- vi) *Hemolisina (amboceptor)*: la hemolisina es un suero de conejo hiperinmune contra eritrocitos de oveja (SRBC). La cantidad utilizada es de 6 dosis hemolíticas leídas considerando que el punto final es el 50% ( $\text{HD}_{50}$  [dosis hemolítica del 50%]). Los SRBC se obtienen por punción aséptica de la vena yugular. Puede conservarse en solución de Alsever o en citrato de sodio. Se utilizan en una suspensión al 6%. La hemolisina también puede comprarse.
- vii) *Sistema hemolítico (HS)*: El sistema hemolítico se prepara diluyendo hemolisina en VB para obtener una dosis de 12  $\text{HD}_{50}$ . Se añade un volumen igual de suspensión de anticuerpos contra SRBC al 6%, y el sistema se sensibiliza en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos con agitación periódica.
- viii) *Complemento (C')*: C' se obtiene a partir de suero normal de cobaya. Se liofiliza y se reconstituye con agua doblemente destilada. Tras la reconstitución, debe guardarse a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Puede utilizarse un complemento que se produce para ser vendido, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se titula creando una serie de diluciones en VB que contengan una cantidad adecuada del antígeno que se utilizará en la prueba. Tras la incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, se añade a cada dilución una cantidad adecuada de SRBC sensibilizados. La titulación se lee tras la incubación durante otros 30 minutos. La dilución más alta que dé una hemólisis completa de los SRBC se considerará 1 unidad C', a partir de la cual puede calcularse la dilución necesaria para obtener 2,5 unidades en 25  $\mu\text{l}$ .

### 2.1.2. Procedimiento analítico (empleando placas de microtitulación)

Los factores más importantes en la realización de la prueba de la CF son el control de los reactivos y que se lleve a cabo por parte de personal formado y cualificado. La temperatura y los tiempos de incubación también deben controlarse cuidadosamente. Todo el procedimiento debe realizarse en una sala con control de la temperatura, a  $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

No pueden analizarse sueros contaminados ni hemolizados, puesto que ello interferiría con la reacción. Las muestras de sueros problema no diluidas y los patrones de trabajo correspondientes deben inactivarse durante 30 minutos en un baño de agua a  $56^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Ello destruirá el complemento de los sueros y reducirá o eliminará la actividad anti-complementaria (ACA).

Normalmente, de forma rutinaria solo se analiza una dilución del suero (1/10 en VB), pero deben prepararse diluciones seriadas para el control positivo (PRS). A partir de placas estándar de microtitulación de 96 pocillos y fondo plano (U), la técnica se lleva a cabo como se describe a continuación:

- i) Se distribuyen 25  $\mu\text{l}$  de suero problema inactivado y diluido a 1/10 en VB en los pocillos de las filas primera y segunda. La primera fila es un control anti-complementario para cada suero.

- ii) Se añaden volúmenes de 25 µl de antígeno a una dosis de 2 CFU a cada pocillo excepto en los de control anti-complementario, a los cuales deben añadirse 25 µl de VB para compensar la falta de antígeno.
- iii) Se añaden 25 µl de C' a una dosis de 2,5 unidades. Se agitan suavemente y se incuban a 37°C durante 30 minutos con agitación periódica (al menos dos veces durante el periodo de incubación) o continua.
- iv) Se añaden 25 µl de HS. Se agitan suavemente y se incuban a 37°C durante 30 minutos. Las placas de microtitulación deben agitarse dos veces durante el periodo de incubación.
- v) Es necesario fijar los siguientes controles:
  - a) C': 0,5 unidades, 1 unidad and 2,5 unidades.
  - b) HS: 75 µl de VB + 25 µl de HS.
  - c) Antígeno: 25 µl de 2 CFU de antígeno + 25 µl de C' a 2,5 unidades + 25 µl de HS = 25 µl de VB.Estos controles, junto con el suero control positivo (PRS) y el suero control negativo (NRS), deben utilizarse siempre en todas las placas de microtitulación o series de placas de microtitulación en que se utilicen los mismos lotes de reactivos.
- vi) *Interpretación de los resultados*

Tras la centrifugación de las placas de microtitulación a 125 **g** durante 5 minutos, el análisis se lleva a cabo en base al porcentaje de fijación del complemento observado.

Resultado positivo: 100% de fijación a 1/10;

Resultados dudosos: 25, 50 o 75% de fijación a 1/10.
- vii) *Validación de los resultados*

Los resultados esperables en los controles de la placa son los siguientes:

  - a) PRS: título esperable.
  - b) NRS: 100% de hemólisis
  - c) Control anti-complementario de muestras de suero: 100% de hemólisis
  - d) Antígeno control: 100% de hemólisis
  - e) Control de unidades de complemento: 100% de hemólisis con 2,5 unidades
  - f) HS control en ausencia de complemento: 0% de hemólisis

Se recomienda que todo resultado de la CF, incluso parcial (del 25, 50 o 75%), a una dilución del suero de 1/10 se confirme mediante otras pruebas, como la inmunotransferencia o el examen post-mortem y pruebas bacteriológicas, según el caso.

## 2.2. Enzimoimmunoanálisis de competición

Un enzimoimmunoanálisis de competición (C-ELISA) desarrollado por el Centro Colaborador de la OIE para el Diagnóstico y Control de las Enfermedades Animales en Países Tropicales (véase la Tabla de la parte 4 de este *Manual Terrestre*) (Le Goff & Thiaucourt, 1998) se ha validado a nivel internacional, de acuerdo con las normas de la OIE (Amanfu *et al.*, 1998). El rendimiento de este C-ELISA también fue validado en 2009 por el Comité Francés de Acreditación.

Comparada con la prueba de FC, la prueba C-ELISA tiene una sensibilidad semejante pero una especificidad mayor. Se puede obtener asesoramiento sobre los protocolos estándar y la disponibilidad de los reactivos en los Laboratorios de Referencia de la OIE para la PCB o en el Centro Colaborador de la OIE para el ELISA y las Técnicas Moleculares en el Diagnóstico de Enfermedades Animales (véase la Tabla de la parte 4 de este *Manual Terrestre*).

Las pruebas de validación llevadas a cabo en varios países europeos y africanos (Amanfu *et al.*, 1998; Le Goff & Thiaucourt, 1998) indicaron i) la comprobación de que la verdadera especificidad del C-ELISA es de al menos un 99,9%; ii) que la sensibilidad del C-ELISA y la de la fijación del complemento son semejantes; y iii) que mediante el C-ELISA los anticuerpos se detectan muy poco tiempo después de que se puedan detectar mediante la prueba FC, y que los anticuerpos detectados mediante el C-ELISA persisten durante más tiempo (Niang *et al.*, 2006).

Para mejorar la repetibilidad y la robustez, esta prueba de C-ELISA se suministra ahora como kit comercial listo para ser utilizado, que contiene todos los reactivos necesarios, incluidas placas ya recubiertas que se sirven en bolsas selladas. Este kit se puede comprar, y se puede comprobar su disponibilidad en el Laboratorio de Referencia de la OIE, en Francia. Ha sido diseñado especialmente para ser robusto y ofrecer una buena reproducibilidad. Los sueros se analizan en pocillos únicos. El cromógeno es TMB (tetrametil benzidina) en tampón líquido, y la lectura se realiza a 450 nm. El color cambia de verde pálido a azul en una primera fase y es amarillo después de añadir la solución de parada. Los controles de los MAb muestran un color más oscuro, mientras que los controles de suero fuertemente positivo son muy claros. El punto de corte se ha fijado en el 50% y debe ser válido en cualquier país. No obstante, cada laboratorio debe establecer su propia incertidumbre de la medición de acuerdo con los requisitos de la norma ISO 17025; véase el capítulo 2.2.4 *Incertidumbre de la medición*.

### 2.3. Prueba de la inmunotransferencia

Una prueba de inmunotransferencia (IBT) es una prueba inmunoenzimática que se ha desarrollado para confirmar resultados de CF o de C-ELISA dudosos. Una estimación en condiciones de campo indicó una especificidad más alta que la prueba de FC, de tal modo que permite detectar falsos positivos de la CF (Gonçalves *et al.* 1998).

#### 2.3.1. Reactivos

- i) Tiras de antígeno (véase el Apartado B.2.3.2, abajo).
- ii) *Suero control positivo*: suero de animales infectados por la PCB de forma natural, utilizados a una dilución de 1/100 en la IBT. Este control presenta un 50% de fijación a la dilución 1/80 en la CF y muestra un perfil de inmunotransferencia con cinco bandas antigénicas específicas de *Mmm* de 110, 98, 95, 62/60 y 48 kDa. Este suero está disponible en el Laboratorio de Referencia de la OIE de Portugal.
- iii) *Tampón de la dilución*: solución salina tamponada con fosfato (PBS), a pH 7,2, que contenga un 0,1% de leche descremada y un 0,1% de ovoalbúmina. La calidad de la leche descremada es un aspecto fundamental, porque influye en la sensibilidad de la reacción. Debe utilizarse leche desnatada estandarizada y no leches deshidratadas no grasas comunes (Gaurivaud & Poumarat, 2012).
- iv) *Suero anti IgG bovina (cadenas H + L) conjugado a peroxidasa*: está a la venta y debe titularse previamente en tablero de ajedrez contra el suero control positivo, para escoger la dilución apropiada a la cual las cinco bandas serán claramente visibles (Gaurivaud & Poumarat, 2012).
- v) *Sustrato*: el sustrato se prepara añadiendo 30 mg de 4-cloro-1naftol, disueltos en 10 ml de metanol, a 50 ml de PBS (pH 7,2) y 30 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. También existen sustratos alternativos, como BCIP/NTB (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato combinado con cloruro de azul de nitrotetrazolio).

#### 2.3.2. Preparación de tiras reactivas

- i) La cepa que se utiliza para preparar el antígeno es fundamental. El antígeno debe prepararse a partir de una cepa de *Mmm* analizada que debe presentar las cinco bandas antigénicas específicas de 110, 98, 95, 62/60 y 48 kDa. El antígeno es una suspensión de células de *Mmm* en PBS, pH 7,2, obtenida de un cultivo de 48 horas.
- ii) El gradiente del gel de poli(acrilamida) del 5-15% que se ha utilizado históricamente (Gonçalves *et al.* 1998) no es óptimo para la repetibilidad de la inmunotransferencia. El uso de gel de poli(acrilamida) del 7,5%, como recomiendan Schubert *et al.* (2011) y Gaurivaud & Poumarat (2012), permite una Buena separación de las cinco proteínas antigénicas y también una buena repetibilidad del patrón entre ejecuciones de la electroforesis.
- iii) Las proteínas separadas se transfieren a membranas de 0,45 µm de nitrocelulosa (14 x 14 cm) a 70 V en tampón de transferencia (20% de metanol, glicina 193 mM, Tris/HCl 25 mM, pH 8,3). La efectividad y homogeneidad de la transferencia deben comprobarse. Ello puede realizarse fácilmente con soluciones de tinción comerciales o kits que permitan una tinción reversible y una obtención del gráfico antes de su uso.
- iv) Se seca la membrana y se marca el lado en el que se encuentran las proteínas. Se incuba la membrana de nitrocelulosa en tampón de bloqueo (PBS con un 5% de leche desnatada, glicina 1 M y 1% de ovoalbúmina) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 15 minutos en PBS con Tween 20 al 0,1% (v/v), la membrana

se lava de nuevo con PBS. Se seca la membrana y se corta una tira, en la cual se comprueba si presenta las cinco bandas específicas de 110, 98, 95, 62/60 y 48 kDa.

- v) La membrana de nitrocelulosa se corta en tiras de 0,4 cm de anchura y se utiliza para las pruebas de anticuerpos. Cada lote de tiras debe analizarse, con un suero de referencia positivo y uno negativo, para comprobar si presenta claramente las cinco proteínas antigénicas específicas y la ausencia de fondo. La resolución de las proteínas de 95 y de 98 kDa debe comprobarse cuidadosamente.

### 2.3.3. Procedimiento analítico

NB: Durante el procedimiento, las tiras deben disponerse con el antígeno hacia arriba.

- i) Las muestras del suero problema se diluyen a 1/3 en tampón de dilución (véase el Apartado B.2.3.1.iii).
- ii) Cada muestra problema, junto con los sueros control positivo y negativo, se pone en contacto con las tiras de antígenos y se incuba a 37°C durante 2 horas agitándola continuamente. Después se lavan las tiras a temperatura ambiente tres veces durante 15 minutos cada una, en Tween-20 al 0,1% (v/v) en PBS, y se lava una vez más en PBS.
- iii) Una dilución adecuada de suero anti IgG bovina conjugado a peroxidasa (cadenas H+L) se incuba con las tiras durante 1 hora a temperatura ambiente y agitando continuamente. Después, se lava como antes.
- iv) El substrato (véase el Apartado B.2.3.1.v) se añade a las tiras, que a continuación se dejan en la oscuridad agitando continuamente y se examinan periódicamente hasta que las bandas de proteínas son visibles (máximo de 30-40 minutos). La reacción se detiene con agua destilada.
- v) *Análisis de los resultados:* Las tiras se secan y se examinan para comprobar si presentan el perfil básico de inmunotransferencia de IgG de las cinco bandas antigénicas específicas de 110, 98, 95, 62/60 y 48 kDa que deben observarse en el suero control positivo. Las muestras que presenten un perfil de inmunotransferencia similar se consideran positivas para la PCB.

NB: La IBT es bastante difícil de estandarizar porque existen muchos factores que pueden influir en el patrón de bandas final (Gaurivaud & Poumarat, 2012). Es importantísimo el estadio del cultivo de *Mmm* y la cepa que se haya escogido. Las cepas recientes de *Mmm* de origen europeo carecen de la banda de 98 kDa. Ello podría comportar resultados dudosos en animales infectados por estas cepas. El Laboratorio de Referencia de la OIE de Portugal para la PCB puede suministrar tiras de antígeno, así como los sueros control positivo y negativo, previa petición.

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

### 1. Antecedentes

Desde principios del siglo XX se han descrito muchas vacunas contra la PCB (como vacunas muertas y vacunas heterólogas), pero ninguna ha demostrado ser realmente satisfactoria ni rentable. En la actualidad, las únicas vacunas utilizadas se producen con cepas atenuadas de *Mmm*.

En el pasado se han utilizado distintas cepas atenuadas de *Mmm*, como las cepas KH3J o V5, pero se han abandonado. Hoy en día, para preparar las vacunas contra la PCB se utilizan dos cepas: la cepa T1/44, una cepa leve por naturaleza y aislada en 1951 por Sheriff y Piercy en Tanzania (Sheriff & Piercy, 1952), y su cepa derivada T1sr (Wesonga & Thiaucourt, 2000; Yaya *et al.*, 1999). El pase número 44 por huevo de la cepa T1, denominada T1/44, se atenuó lo suficiente como para proteger al ganado bovino sin producir reacciones post-vacunales importantes, pero en condiciones de campo pueden seguir apareciendo tales reacciones, aunque de forma muy poco frecuente e impredecible. Antes de proceder a una vacunación masiva, debe comprobarse la sensibilidad de cada raza bovina. Es importante destacar que, cuando se administra por intubación, la vacuna puede causar lesiones de PCB (Mbulu *et al.*, 2004); sin embargo, dado que la vacuna se inyecta por vía subcutánea, no debe crear un riesgo grave (Hubschle *et al.*, 2002).

Las vacunas que se preparan con las cepas T1/44 y T1sr permite proteger de forma efectiva los rebaños cuando estos se vacunan regularmente (es decir, una vez al año en el caso de la cepa T1/44, y dos veces al año en el caso de la T1rs). Puede utilizarse para el control de la PCB a mayor escala (nacional o regional), pero no permiten una erradicación de la PCB cuando se utilizan sin ningún otro medio.

Las especies de destino son hospedadores susceptibles de los géneros *Bos* y *Bubalus*.

Las vacunas atenuadas nuevas tienen menos virulencia residual que las que contienen la cepa T1/44, pero mantienen o mejoran la duración de la inmunidad (1 año) y de la inmunogenicidad.

Las vacunas inactivadas nuevas deben inducir una inmunidad considerablemente más duradera (> 1 año), no deben obstaculizar la detección de brotes de PCB y, teóricamente, deben ser compatibles con otros antígenos, para que se puedan producir vacunas multivalentes.

En el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias* se proporcionan las directrices para la producción de vacunas veterinarias. Las directrices de este capítulo y del capítulo 1.1.8 son de carácter general porque los fabricantes podrían tener que cumplir con los requisitos de la Farmacopea Europea, del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (de América) u otros requisitos nacionales o regionales.

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

### 2.1. Características del inóculo

#### 2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

Actualmente, para la vacunación contra la PCB solo se recomiendan dos cepas atenuadas de *Mmm*: la T1/44 y la T1sr. La T1/44 se atenúa pasando una cepa leve de campo 44 veces por huevos embrionados. Ello asegura una atenuación de la cepa manteniendo sus propiedades inmunógenas. No obstante, en esta cepa se ha observado cierta virulencia residual y el porcentaje de animales que dan un resultado positivo varía en gran medida entre regiones. Estas reacciones suelen observarse en animales vacunados por primera vez. Se ha observado que la inmunogenicidad disminuye a medida que aumenta la atenuación. La cepa T1sr es un derivado directo de la cepa T1/44, adaptada a la resistencia a la estreptomina mediante cuatro pases seriados por medios de crecimiento con concentraciones crecientes de estreptomina. La T1sr no tiene virulencia residual pero induce inmunidad durante un periodo más corto (de 6 meses).

El inóculo primario que se utilice para producir vacuna debe ser lo más cercano posible a las cepas vacunales originales. En el Laboratorio de Referencia de la OIE, en Francia, y en el Centro Colaborador de la OIE para el Control de Calidad de las Vacunas Veterinarias, en Etiopía, se guarda la reserva principal de estas cepas.

La secuencia del genoma de la cepa T1/44 se publicó en 2016 (Gourgues *et al.*, 2016).

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

Se recomienda cultivar el inóculo primario en un medio adecuado que no contenga ningún conservante, como por ejemplo antibióticos, para poder mostrar que la reserva de inóculo primario es pura. La ausencia de agentes extraños debe comprobarse según las directrices internacionales y/o nacionales. Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario se hallan en el capítulo 1.1.9.

La pureza y la identidad del inóculo primario son difíciles de establecer por técnicas microbiológicas convencionales. En particular, los aspectos morfológicos de las colonias de micoplasmas en medios sólidos no son característicos y pueden variar según la composición del medio (como el porcentaje de suero o agar, por ejemplo). Además, se ha observado que el inóculo primario de T1/44 podría dar lugar a colonias de distintos aspectos, quizás en relación con antígenos hipervariables. De ahí que la pureza del inóculo primario deba establecerse tras un procedimiento de filtración-clonación e identificación específica de al menos 10 clones individuales. Las cepas de T1 se pueden identificar mediante una PCR específica (Lorenzon *et al.*, 2000). Los clones de la cepa T1sr se puede diferenciar de T1/44 por su capacidad de crecer en presencia de estreptomina.

#### 2.1.3. Validación como cepa vacunal

Aunque las cepas de *Mmm* ahora se pueden subtipificar por marcadores moleculares muy afinados, todavía no existen pruebas de que una sola cepa vacunal no pueda proteger contra todas las cepas circulantes de *Mmm*.

i) Inocuidad

Como se ha indicado anteriormente, la cepa T/44 tiene una virulencia residual conocida que puede variar según las condiciones del lugar. Las reacciones post-vacunales se caracterizan por una reacción inflamatoria localizada que aparecen en el punto de inyección (reacción de Willem). Puede observarse apenas 1 semana tras la inyección. En muchos casos, esta reacción local menguará de manera natural, pero en otros podría extenderse y comportar la muerte del animal si no se administra el tratamiento antibiótico adecuado. Dado que el porcentaje de animales que dará un resultado positivo es impredecible, los estudios preliminares con pocos animales no proporcionan una garantía completa de inocuidad.

Tras la reconstitución, el inóculo primario se inocular por vía subcutánea en dos ratones, por vía intraperitoneal en otros dos ratones, y por vía intraperitoneal en dos cobayas machos. Ninguno de los animales debe morir antes de un mes, y los cobayas no deben presentar signos de orquitis. Deben realizarse pruebas de inocuidad (al menos dos) en ganado bovino o cebúes, a cada uno de los cuales que se inoculan diez dosis; se observan para comprobar si presentan efectos adversos, durante al menos 4 semanas.

ii) Inmunogenicidad

En el caso de la PCB, no existe ningún animal de laboratorio que sea susceptible y permita un control fácil de la potencia. Tampoco existe una correlación estricta entre los títulos de anticuerpos observados tras la vacunación y la verdadera protección. La única forma de controlar la potencia de una vacuna es llevar a cabo una exposición natural del hospedador natural por el método de la "puesta en contacto". La potencia de la reserva principal se ha evaluado. La primovacunación con la dosis mínima requerida dio una tasa de protección del 40–60%. Tras reiteradas vacunaciones se han obtenido tasas de protección superiores.

## 2.2. Método de fabricación

### 2.2.1. Procedimiento

Los cultivos de vacuna a granel deben obtenerse con un máximo de tres pases consecutivos del inóculo primario. Un pase se define en este contexto como una dilución a 1/100 de un cultivo en la fase exponencial de crecimiento. Por ejemplo, 0,5 ml de cultivo del inóculo se transfieren a 50 ml de medio nuevo y, cuando se observa turbidez, estos 50 ml se utilizan para inocular 5.000 ml de medio, que constituirán el producto final una vez alcanzado el título óptimo. Cada productor de vacuna debe evaluar, a continuación, la velocidad de crecimiento de la cepa vacunal en el medio que se utilice para optimizar el plazo de recolección.

Puede añadirse un estabilizante a los cultivos finales antes del liofilizado. El fabricante debe asegurarse de que la distribución en los viales es homogénea, y utilizar un liofilizante adecuado para obtener títulos similares en todos los viales al finalizar el proceso de liofilización.

### 2.2.2. Requisitos para los ingredientes

Se precisa un medio líquido estéril adecuado que permita el crecimiento de la cepa vacunal al título exigido. Normalmente, está formado por una "base" que puede esterilizarse en autoclave, y que a continuación se suplementa para que permita el crecimiento de micoplasmas. Esta base consiste en un digesto cárnico. Puede prepararse internamente o bien comprarse en polvo (por ejemplo, infusión de cerebro-corazón, caldo PPLO, etc.). El suplemento suele consistir en un suero animal (a menudo suero de caballo a una concentración final del 10%), extracto de levadura fresco (5-10%) y otros ingredientes, como glucosa, glicerol, ADN y ácidos grasos. Aunque no existe ningún requisito específico en cuanto a la composición del medio, sí debe garantizarse que todos los ingredientes cumplan con un perfil de calidad, como se menciona en el capítulo 1.1.8, especialmente cuando se trata de productos de origen biológico, y que se respeten todos los requisitos de aplicación nacional.

Normalmente se recomienda que no se añada al medio ningún conservante, como penicilina o antibióticos similares. No obstante, la cepa T1sr debe cultivarse en un medio que contenga 1 mg/ml de estreptomina, para impedir la reversión a la sensibilidad a la estreptomina.

### 2.2.3. Controles durante el proceso

Se recomienda evaluar la pureza del producto durante el proceso de producción. Por ejemplo, la pureza puede evaluarse rápidamente, antes de la liofilización, observando al microscopio a 40x con transiluminación con contraste de fases. Los micoplasmas son puntos grises muy pequeños, que a veces forman cadenas y tienen una agitación browniana. Las bacterias clásicas son mucho más grandes y brillantes, y a veces presentan una clara movilidad.

### 2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad

Deben realizarse pruebas de esterilidad y de ausencia de contaminación de los materiales biológicos de uso veterinario de acuerdo con las recomendaciones de este *Manual Terrestre* (capítulo 1.1.9) o según las reglamentaciones de ámbito nacional.

ii) Identidad

Véase el apartado C.2.1.2.

iii) Estabilidad

Los productos liofilizados se consideran estables cuando se conservan a  $-20^{\circ}\text{C}$  (es decir, durante varios años).

La estabilidad puede acortarse cuando se almacenan productos liofilizados a  $4^{\circ}\text{C}$ . Esta estabilidad puede variar por varios motivos, como la calidad de los viales o de los taponeros, o el proceso de liofilización. Es responsabilidad del productor de la vacuna comprobar que este producto siga teniendo el título exigido al final del periodo de validez.

Con este fin, se recomienda que la humedad residual del producto no supere el 3%.

v) Potencia del lote

NB: las pruebas de potencia no se realizan de manera rutinaria con lotes de producción porque no existe ningún animal de laboratorio que permita realizar esta prueba a bajo coste. Tampoco se realizan pruebas de potencia en el ganado bovino, por el mismo motivo. Conseguir tasas de protección estadísticamente significativas implicaría utilizar al menos 50 animales nunca antes expuestos.

La potencia del producto final se asegura utilizando un lote de inóculo primario de origen conocido en el cual ya se haya realizado la prueba de potencia, siguiendo estrictamente los protocolos estándar de producción (evitando múltiples pases) y garantizando que los títulos finales sean correctos.

El título mínimo es de  $10^7$  micoplasmas vivos por dosis de vacuna, pero se recomiendan títulos más altos por la pérdida de título que tiene lugar entre la planta de producción y el momento en que la vacuna realmente se inyecta a los animales. La titulación se lleva a cabo tras reconstituir la vacuna liofilizada en el diluyente recomendado para la vacunación, que preferiblemente debe ser el diluyente que suministra el fabricante de la vacuna. Deben titularse al menos tres viales por lote. Este título debe evaluarse con una técnica de titulación que permita una precisión de  $\pm 0.25$  logaritmos. Un lote supera la prueba si tres viales escogidos aleatoriamente tienen títulos de al menos  $10^7$  micoplasmas vivos por dosis de vacuna. Los fabricantes deben asegurarse de que sus procesos de producción sean capaces de generar lotes homogéneos con las mínimas variaciones posibles entre un vial y otro. En este caso, tres viales son suficientes para evaluar el título de un lote. De lo contrario, deben implementarse estrategias de muestreo que garanticen que el número de muestras es suficiente como para representar el lote de vacuna. El fabricante también debe asegurarse de que el título mínimo se mantenga hasta a lo largo de todo el periodo de validez, dando por supuesto que el producto se conservará a la temperatura correcta.

## 2.3. Requisitos para la aprobación del registro

### 2.3.1. Proceso de fabricación

Para la aprobación de la vacuna, deben presentarse a las autoridades todos los datos pertinentes relativos a la fabricación de la vacuna y a las pruebas de control de calidad (véanse

los apartados C.2.2.1 y C.2.2.2). Esta información debe corresponder a tres lotes consecutivos de vacuna cuyo volumen no sea inferior a 1/3 del volumen habitual de un lote industrial.

Los controles realizados durante el proceso forman parte del proceso de fabricación.

### 2.3.2. Requisitos de inocuidad

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

Solo deben realizarse pruebas de inocuidad respecto a las especies de destino (es decir, del género *Bos*).

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas y aspectos medioambientales

Se sabe que las cepas T1/44 inducen reacciones post-vacunales en algunos animales que han sido vacunados por primera vez. En la ficha técnica que describa esta vacuna deben incluirse las advertencias correspondientes, incluido el tratamiento antibiótico que se recomienda. Las reacciones subcutáneas locales no deben considerarse un peligro para el ganado bovino nunca antes expuesto, porque normalmente no hay excreción, pero en ausencia de datos fiables, en los rebaños bovinos en que se hayan observado reacciones post-vacunales debe implementarse una vigilancia.

iii) Precauciones (peligros)

Las vacunas contra la PCB que contienen las cepas T1/44 y T1sr y que han superado los controles de calidad son inocuas para el ser humano.

### 2.3.3. Requisitos de eficacia

Como consecuencia del altísimo coste de las pruebas de eficacia en el ganado bovino, solo se pretende conseguir una garantía indirecta. Los productores de vacuna deben asegurarse de que todos los lotes se hayan producido a partir de una reserva principal de referencia de origen y características conocidos, siguiendo unas buenas prácticas de fabricación y, más específicamente, que el producto final no se haya obtenido por procedimientos que puedan haber inducido una desviación respecto al inóculo primario original.

También debe recordarse que los rebaños bovinos solo llegan a estar totalmente protegidos tras varias vacunaciones.

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

No es aplicable a las vacunas actuales contra la PCB.

### 2.3.5. Duración de la inmunidad

No se exige en las vacunas actuales contra la PCB.

### 2.3.6. Estabilidad

Además del procedimiento de aprobación, el fabricante también está obligado a demostrar la estabilidad del título vacunal al final del periodo de validez indicado. En el caso de productos liofilizados, debe indicarse la temperatura de almacenamiento, y también para el producto final una vez reconstituido con los diluyentes adecuados. Deben incluirse advertencias acerca de las consecuencias del deterioro que puede sufrir la vacuna si se almacena a temperaturas inadecuadas.

## BIBLIOGRAFÍA

AMANFU W., SEDIADIE S., MASUPU K.V., BENKIRANE A., GEIGER R. & THIAUCOURT F. (1998). Field validation of a competitive ELISA for the detection of contagious bovine pleuropneumonia in Botswana. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **51**, 189–193.

BASHIRUDDIN J. B., NICHOLAS R. A. J., SANTINI F. G., READY R. A., WOODWARD M.J. & TAYLOR T. K. (1994). Use of the polymerase chain reaction to detect *Mycoplasma* DNA in cattle with contagious pleuropneumonia. *Vet. Rec.*, **134**, 240–241.

- BELLINI S., GIOVANNINI A., DI FRANCESCO C., TITTARELLI M. & CAPORALE V. (1998). Sensitivity and specificity of serological and bacteriological tests for contagious bovine pleuropneumonia. *Rev. sci. tech. OIE Int. Epiz.*, **17**, 654–659.
- BROCCHI E., GAMBA D., POUMARAT F., MARTEL J.L. & DE SIMONE F. (1993). Improvements in the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia through the use of monoclonal antibodies. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **12**, 559–570.
- DEDIEU L., MADY V. & LEFEVRE P.C. (1994). Development of a selective polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (contagious bovine pleuropneumonia agent). *Vet. Microbiol.*, **42**, 327–339.
- DUPUY V., MANSO-SILVAN L., BARBE V., THEBAULT P., DORDET-FRISONI E., CITTI C., POUMARAT F., BLANCHARD A., BRETON M., SIRAND-PUGNET P. & THIAUCOURT F. (2012). Evolutionary history of contagious bovine pleuropneumonia using next generation sequencing of *Mycoplasma mycoides* Subsp. *mycoides* “Small Colony”. *PLoS ONE*, **7**(10):e46821.
- EUROPEAN COMMISSION (2001). Health & Consumer Protection Directorate-General. Diagnostic tests for contagious bovine pleuropneumonia. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. Adopted 17 October 2001. SANCO/AH/R25/2001.
- FREUNDT E.A., ERNO H. & LEMCKE R.M. (1979). Identification of mycoplasmas. *In: Methods in Microbiology*, Vol. 13, Bergen T. & Norris J.R., eds. Academic Press, London, UK, 377–434.
- GAURIVAUD P. & POUMARAT F. (2012). Serodiagnosis of contagious bovine pleuropneumonia by immunoblotting. Euroreference, winter 2012, N°8, <http://www.ansespro.fr/euroreference/Documents/ER08-Meth-PeripneumoEN.pdf>
- GONÇALVES R., REGALLA J., NICOLET J., FREY J., NICHOLAS R., BASHIRUDDIN J., DE SANTIS P. & PENHA GONÇALVES A. (1998). Antigen heterogeneity among *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC isolates: discrimination of major surface proteins. *Vet. Microbiol.*, **63**, 13–28.
- GOURGUES G., BARRÉ A., BEAUDOING E., WEBER J., MAGDELENAT G., BARBE V., SCHIECK E., JORES J., VASHEE S., BLANCHARD A., LARTIGUE C. & SIRAND-PUGNET P. (2016). Complete Genome Sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* T1/44, a Vaccine Strain against Contagious Bovine Pleuropneumonia. *Genome Announc.*, **4**, e00263-00216.
- HUBSCHLE O., LELLI R., FREY J. & NICHOLAS R.A.J. (2002). Contagious bovine pleuropneumonia and vaccine strain T1/44. *Vet. Rec.*, **150**, 615.
- ISO/IEC (2005). ISO/IEC 17025:2005. General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories. International Organization for Standardization (ISO), [www.iso.org](http://www.iso.org).
- LE GOFF C. & THIAUCOURT F. (1998). A competitive ELISA for the specific diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Vet. Microbiol.*, **60**, 179–191.
- LORENZON S., DAVID A., NADEW M., WESONGA H. & THIAUCOURT F. (2000). Specific PCR identification of the T1 vaccine strains for contagious bovine pleuropneumonia. *Mol. Cell. Probes*, **14**, 205–210.
- LORENZON S., MANSO-SILVAN L. & THIAUCOURT F. (2008). Specific real-time PCR assays for the detection and quantification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. *Mol. Cell. Probes*, **22** (5-6), 324–328.
- MANSO-SILVÁN L., VILEI E.M., SACHSE K., DJORDJEVIC S.P., THIAUCOURT F. & FREY J. (2009). *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59** (Pt 6), 1353–1358.
- MBULU R.S., TJIPURA-ZAIRE G., LELLI R., FREY J., PILO P., VILEI E.M., METTLER F., NICHOLAS R.A. & HUEBSCHLE O.J. (2004). Contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) caused by vaccine strain T1/44 of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet. Microbiol.*, **98**, 229–234.
- MISEREZ R., PILLOUD T., CHENG., NICOLET J., GRIOT C. & FREY J. (1997). Development of a sensitive nested PCR method for the specific detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Mol. Cell. Probe*, **11**, 103–111.

NIANG M., DIALLO M., CISSE O., KONE M., DOUCOURE M., ROTH J.A., BALCER-RODRIGUES V. & DEDIEU L. (2006). Pulmonary and serum antibody responses elicited in zebu cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC by contact exposure. *Vet. Res.*, **37**, 733–744.

PROVOST A. (1972). Recherches immunologiques sur la péripneumonie. XIV. Description de deux techniques applicables sur le terrain pour le diagnostic de la maladie. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **25**, 475–496.

PROVOST A., PERREAU P., BREARD A., LE GOFF C., MARTEL J.L. & COTTEW G.S. (1987). Péripneumonie contagieuse bovine. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **6**, 565–624.

SANTINI F.G., VISAGGIO M., FARINELLI G., DI FRANCESCO G., GUARDUCCI M., D'ANGELO A.R., SCACCHIA M. & DI GIANNATALE E. (1992). Pulmonary sequestrum from *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides* SC in a domestic buffalo; isolation, anatomo-histopathology and immuno-histochemistry. *Veterinaria Italiana*, **4**, 4–10.

SCHUBERT E., SACHSE K., JORES J. & HELLER M. (2011). Serological testing of cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony using four different tests reveals a variety of seroconversion patterns. *BMC Vet. Res.*, **7**, 72.

SHERIFF D. & PIERCY S.E. (1952). Experiments with an avianised strain of the organism of contagious bovine pleuropneumonia. *Vet. Rec.*, **64**, 615–621.

SRIVASTAVA N.C., THIAUCOURT F., SINGH V.P., SUNDER J. & SINGH V.P. (2000). Isolation of *Mycoplasma mycoides* small colony type from contagious caprine pleuropneumonia in India. *Vet. Rec.*, **147**, 520–521.

WESONGA H.O. & THIAUCOURT F. (2000). Experimental studies on the efficacy of T1sr and T1/44 vaccine strains of *MmmSC* against a field isolate causing contagious bovine pleuropneumonia in Kenya – Effect of a revaccination. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **53**, 313–318.

YAYA A., GOLSIA R., HAMADOU B., AMARO A. & THIAUCOURT F. (1999). Essai comparatif d'efficacité des deux souches vaccinales T1/44 et T1sr contre la péripneumonie contagieuse bovine. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **52**, 171–179.

\*  
\* \*

**NB:** Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la perineumonía contagiosa bovina (puede consultarse la página web de la OIE: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>) Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para información adicional sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la perineumonía contagiosa bovina.

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2021.