

TEILERIOSIS EN BOVINOS (INFECCIÓN POR *THEILERIA ANNULATA*, *T. ORIENTALIS* Y *T. PARVA*)

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: Los parásitos del ganado vacuno transmitidos por las garrapatas del género *Theileria* constituyen un grave inconveniente para la mejora de la producción pecuaria en amplias regiones de Europa, África, Asia, Australia y Nueva Zelanda. Las especies más importantes desde el punto de vista económico, *Theileria annulata* y *T. parva*, son responsables de la mortalidad y de las pérdidas en la producción. Generalmente, la teileriosis bovina se controla mediante el uso de acaricidas para eliminar a las garrapatas, aunque este método no es sostenible. Los acaricidas son caros, causan daños ambientales y, con el tiempo, las garrapatas han desarrollado resistencias frente a muchos de ellos, requiriendo la elaboración de otros nuevos. Se necesitan métodos más sostenibles y fiables para el control de la teileriosis en los que se combinen un control estratégico de las garrapatas y la vacunación. Sin embargo, todavía no se han aplicado con éxito en las áreas endémicas.

Identificación del agente: El diagnóstico de gran variedad de síndromes provocados por los parásitos se basa principalmente en los signos clínicos, el conocimiento de la enfermedad y de la distribución del vector, y en la identificación de los parásitos en los frotis de sangre y de ganglios linfáticos teñidos mediante Giemsa. La presencia de esquizontes multinucleados intracitoplasmáticos y libres en los frotis de biopsias de los ganglios linfáticos es un tipo de diagnóstico característico de las infecciones agudas producidas por *T. parva* y *T. annulata*. Los animales infectados por *T. parva* presentan una hipertrofia de los ganglios linfáticos, que empieza en el ganglio linfático parotídeo, fiebre, una frecuencia respiratoria que aumenta paulatinamente, disnea y diarrea esporádica. Las lesiones post-mortem observadas son edema pulmonar con espuma en la tráquea, esplenomegalia e hipertrofia de tamaño de los ganglios linfáticos, hemorragias en los órganos internos, erosiones abomasales y presencia de linfocitos parasitados e infiltraciones linfoproliferativas en los tejidos viscerales. Las lesiones anatomopatológicas macroscópicas provocadas por los esquizontes de *T. annulata* recuerdan las de *T. parva*, aunque las fases de piroplasma también pueden ser patógenas, causando anemia e ictericia. En el caso de *T. annulata*, los primeros ganglios linfáticos afectados son los pre-cruales, como consecuencia de los puntos predilectos de las garrapatas que actúan como vectores.

Pruebas moleculares: Además, se está demostrando que las pruebas de diagnóstico molecular, en particular la reacción en cadena de la polimerasa y la hibridación de línea inversa, son herramientas poderosas para detectar parásitos del género *Theileria* en hospedadores tanto vertebrados como invertebrados, caracterizar los polimorfismos a nivel de especie y de parásito, definir una genética de poblaciones y generar datos epidemiológicos.

Pruebas serológicas: La prueba más ampliamente utilizada para el diagnóstico de las especies de *Theileria* ha sido la inmunofluorescencia indirecta (IFA). Para llevarla a cabo, pueden prepararse antígenos de esquizonte y piroplasma sobre portas o en suspensión y almacenarse mediante congelación a $\leq -20^{\circ}\text{C}$, excepto en el caso de la suspensión de piroplasmas, que se guarda a 4°C . Los sueros problema se diluyen con solución salina tamponada con fosfato y se incuban con el antígeno en suspensión, y entonces se añade un conjugado anti inmunoglobulina bovina. La fluorescencia es específica para el agente causal si se utiliza el ensayo como se describe. La IFA es sensible, bastante específica y, normalmente, fácil de realizar. Sin embargo, presenta limitaciones para los estudios a gran escala en las zonas donde se solapan las especies, debido a los problemas

de reacciones cruzadas entre algunas especies de *Theileria*. La IFA para *T. parva* no sirve para distinguir entre las diferentes cepas inmunógenas. Un enzimoimmunoanálisis indirecto para *T. parva* y *T. mutans*, basado en antígenos recombinantes específicos del parásito ha demostrado mayor sensibilidad y especificidad.

Requisitos para las vacunas: Se han elaborado vacunas fiables, de eficacia conocida frente a *T. parva* y *T. annulata*. Para *T. annulata*, la vacuna se prepara a partir de líneas celulares infectadas con esquizontes que se han aislado de ganado vacuno y se han atenuado durante el cultivo in-vitro. La vacuna debe mantenerse congelada hasta poco antes de su administración. La vacunación frente a *T. parva* se basa en un método de infección y tratamiento en el cual al ganado vacuno se le administra una dosis subcutánea de esporozoitos derivados de las garrapatas y un tratamiento simultáneo con una formulación de tetraciclina de acción prolongada. Este tratamiento da como resultado una reacción de fiebre de la Costa Este leve o subclínica seguida de la recuperación. Los animales restablecidos presentan una inmunidad fuerte frente a un desafío con cepas homólogas y, en grados variables, frente al desafío con cepas heterólogas, la cual se mantiene durante toda la vida del animal. En las zonas endémicas que se caracterizan por una intensidad de transmisión alta, es deseable vacunar a los animales con lotes que generen una inmunización de amplio espectro para cubrir todo el rango de cepas naturales de *T. Parva* inmunológicamente bien diferenciadas. Los animales inmunizados pueden llegar a hacerse portadores del concentrado parasitario inmunizante. Deben tomarse precauciones de seguridad durante la preparación y la manipulación de las vacunas de *T. parva* para proteger a los trabajadores y para evitar la contaminación de los estabilizados. También debe considerarse el riesgo de introducir nuevas cepas en una zona en la que puedan establecerse a través de animales que se conviertan en portadores.

A. INTRODUCCIÓN

Las teilerias son parásitos protozoarios intracelulares obligados que infectan a animales de la familia Bovidae salvajes y domésticos en la mayor parte del mundo. Se transmiten por garrapatas de la familia Ixodidae, y presentan ciclos vitales complejos en los hospedadores vertebrados e invertebrados. Existen varias especies de *Theileria* sp. que infectan el ganado vacuno; *T. parva* y *T. annulata* son las dos más virulentas y las más importantes desde el punto de vista económico. *T. parva* se encuentra en 13 países del África subsahariana y causa la fiebre de la Costa Este (FCE), mientras que *T. annulata* (teileriosis tropical/mediterránea) tiene lugar en el sur de Europa así como en norte de África y en Asia. Las regiones endémicas de *T. annulata* y de *T. parva* no se solapan. *Theileria annulata* puede infectar al ganado vacuno, yaks, búfalos acuáticos y camellos, y se transmite por garrapatas del género *Hyalomma*. La teileriosis tropical es más grave en las razas europeas, con una tasa de mortalidad del 40–90%, mientras que la tasa de mortalidad en las razas autóctonas de ganado vacuno de las regiones endémicas puede ser de apenas un 3%. En España, las infecciones por *T. annulata* se restringen principalmente a las zonas del sur y mediterráneas, como la isla de Menorca, donde se halla la garrapata vector (*Hyalomma* sp.). En el norte de España, los informes de la presencia de garrapatas del género *Hyalomma* son esporádicos, porque se asocian a infecciones por *T. annulata*. No obstante, la distribución de la garrapata podría cambiar debido a cambios en las condiciones climáticas. Actualmente, se considera que el complejo *Theileria orientalis/buffeli* está formado por dos especies (*T. orientalis*, que está presente en el lejano oriente, y *T. buffeli*, que tiene una distribución mundial (Gubbels et al., 2000; Jeong et al., 2010). Esta infección en general es subclínica, pero el ganado bovino puede manifestar la enfermedad en función de varios factores epidemiológicos (como la exposición previa a teilerias, estrés o el estado sanitario, y variaciones en la patogenicidad de la especie, como se ha documentado recientemente en Australia y Nueva Zelanda) (Gebrekidan et al., 2015; McFadden et al., 2011). *Theileria taurotragi* y *T. mutans* generalmente no causan enfermedad o bien causan enfermedad leve, y *T. velifera* no es patógena. Estos últimos tres parásitos se encuentran principalmente en África, y se superponen en sus distribuciones, lo que complica la epidemiología de la teileriosis en el ganado bovino.

Theileria lestoquardi, que también se transmite por garrapatas del género *Hyalomma*, es la única especie de importancia económica que infecta a pequeños rumiantes y también se encuentra en el norte de África, la cuenca del Mediterráneo y Asia. En ovejas y cabras, la tasa de morbilidad de *T. lestoquardi* puede acercarse al 100%, y la de mortalidad es del 46–100% en la mayoría de razas susceptibles.

Theileria uilenbergi y *T. luwenshuni* son piroplasmas ovinos patógenos que se han descrito en el noroeste de China (Rep. Popular de), aunque se han encontrado parásitos del género *Theileria* con secuencias similares en

ovejas del norte de España y de Turquía, pero aparentemente con una patogenicidad baja. *Theileria luwenshuni* también se ha detectado en ovejas del Reino Unido asociada a signos clínicos (Phipps et al., 2016).

Algunas de las cepas de *T. parva* provocan un estado de portador en el ganado vacuno recuperado, y algunos estudios recientes en los que se utilizaron marcadores de ADN para cepas del parásito han mostrado que los animales portadores de *T. parva* constituyen una fuente de infección y que el parásito puede transmitirse por las garrapatas de forma natural en el campo (Bishop et al., 1992; Kariuki et al., 1995; Marcotty et al., 2002; Maritim et al., 1989). La gravedad de la fiebre de la Costa Este (FCE) puede variar dependiendo de factores tales como la virulencia de la cepa del parásito, las tasas de infección de esporozoítos en las garrapatas y el perfil genético de los animales infectados. A menudo se observa que el ganado vacuno autóctono de las zonas endémicas de FCE experimenta una enfermedad leve o una infección subclínica, mientras que el ganado vacuno indígena o exótico introducido suele desarrollar una enfermedad grave.

El método más práctico y más ampliamente utilizado para el control de la teileriosis consiste en el control químico de las garrapatas con acaricidas. Sin embargo, la práctica del control de las garrapatas no es siempre muy eficaz debido a varios factores que incluyen la resistencia al acaricida, su elevado coste, la deficiente gestión del control de las garrapatas y el movimiento ilegal del ganado vacuno en muchos países. Para *T. annulata*, se ha utilizado ampliamente la vacunación usando líneas celulares infectadas por esquizontes atenuados, mientras que para el control de *T. parva* en varios países de África del este, central y del sur, se está aplicando la infección empleando esporozoítos derivados de las garrapatas y el tratamiento con tetraciclina.

Para tratar *T. parva* y *T. annulata*, se utilizan agentes quimioterápicos como la parvacuona, la buparvacuona y la halofuginona. Los tratamientos con estos agentes se basan en una detección temprana de los animales afectados clínicamente y no erradican por completo las infecciones por teilerias, provocando el desarrollo de estados de portador en los hospedadores.

La respuesta inmunitaria frente a estos parásitos es complicada. La inmunidad celular se supone que es la respuesta protectora más importante tanto en el caso de *T. parva* como de *T. annulata*. En *T. parva*, las principales respuestas protectoras se encuentran mediadas a través la matanza de las células infectadas por parte de los linfocitos T citotóxicos de la clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Los esquizontes de *Theileria annulata* viven en los macrófagos y en las células B. La respuesta inmunitaria adaptativa y la innata se potencian para proteger al ganado vacuno contra la teileriosis por *T. annulata*. La mayoría de parásitos intracelulares resultan afectados por la inmunidad celular. La infección de los leucocitos por *T. annulata* activa la liberación de citoquinas, iniciando una respuesta inmunitaria y ayudando a presentar el antígeno del parásito a las células T CD4⁺. Estas células producen γ -interferón (IFN- γ), que activa macrófagos no infectados para que sinteticen el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y óxido nítrico (NO), que destruyen las células infectadas por los esquizontes y por piroplasmas. Recientemente se ha observado que las células CD8⁺ T reconocen antígenos del parásito presentados por el MHC y matan leucocitos infectados. Las células B producen anticuerpos que junto con el NO matan a los merozoítos extracelulares y a los piroplasmas intracelulares. Por otro lado, la superproducción de citoquinas, en particular TNF- α , por los macrófagos genera muchos de los signos clínicos y de las lesiones anatomopatológicas que caracterizan a la teileriosis por *T. annulata*, y el resultado de la infección depende del equilibrio final entre las propiedades protectoras y las patológicas del sistema inmunitario.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la teileriosis aguda se basa en los signos clínicos, el conocimiento de la enfermedad y la distribución del vector, así como el examen de frotis de sangre, de ganglios linfáticos y de improntas de tejidos teñidos con Giemsa. *Theileria parva* y *T. annulata* se diagnostican mediante la detección de los esquizontes en los leucocitos o de los piroplasmas en los eritrocitos. La fase de piroplasma sigue a la fase de esquizonte y, tanto en *T. parva* como en *T. annulata*, generalmente es menos patógena y, por tanto, se encuentra a menudo en caso de animales recuperados o menos agudos. Se espera que una combinación de enzimoimmunoanálisis (ELISA) y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mejorarán en gran medida nuestra capacidad actual de identificar animales infectados, posibilitando así estudios exactos de las especies de *Theileria*. El objetivo último sería desarrollar estas tecnologías para el diagnóstico de todas las enfermedades transmitidas por vector.

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la teileriosis 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
Identificación del agente^(a)						
Examen al microscopio	–	+++	–	+++	–	–
PCR	+	++	++	+++	+	–
Detección de la respuesta inmunitaria						
IFA	+	+++	++	–	+++	–
ELISA	+	+	–	–	+	–

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; IFA = inmunofluorescencia indirecta; ELISA = enzimoimmunoanálisis.

^(a)Se recomienda una combinación de métodos de identificación del agente en la misma muestra clínica.

1. Identificación del agente

1.1. Examen al microscopio

En los frotis de las biopsias de ganglios linfáticos teñidos con Giemsa, se pueden encontrar esquizontes multinucleados intralinfocíticos o extracelulares, y esto constituye un rasgo diagnóstico característico de las infecciones agudas por *T. parva* y *T. annulata*. Pueden detectarse tanto esquizontes intracelulares como extracelulares, y estos últimos serán los que han resultado liberados de células parasitadas durante la preparación de los frotis. Los esquizontes son transitorios en el grupo *T. mutans* y en el grupo *T. orientalis/buffeli*, en los cuales la fase de piroplasma puede ser patógena. Los esquizontes de *T. taurotragi* no se detectan fácilmente en frotis de sangre teñidos mediante Giemsa. *T. velifera* puede distinguirse por la presencia de un velo en un lado del piroplasma. Los esquizontes de *T. mutans*, si se detectan, se diferencian claramente de los de *T. parva*, y presentan partículas nucleares más grandes, aplanadas e irregulares. Los piroplasmas (fase intraeritrocitaria) de *T. parva*, *T. annulata* y *T. mutans* son parecidos, aunque los de *T. annulata* y *T. mutans*, normalmente, son más grandes y puede observarse cómo se dividen. Sin embargo, desde un punto de vista práctico, los esquizontes y los piroplasmas de las diferentes teilerias son muy difíciles de distinguir en frotis teñidos mediante Giemsa.

La fase patógena de *T. parva* y *T. annulata* es el esquizonte. Al principio causa un proceso linfoproliferativo, y más tarde provoca una enfermedad linfodestructiva. El animal infectado presenta un aumento de tamaño de los ganglios linfáticos, fiebre, aumento gradual de la frecuencia respiratoria, disnea y/o diarrea. Las lesiones post-mortem más frecuentes consisten en ganglios linfáticos aumentados de tamaño, una considerable esplenomegalia, edema pulmonar, espuma en la tráquea, erosiones y ulceración en el abomaso, y enteritis con necrosis de las placas de Peyer. Los tejidos linfoides aumentan de tamaño en las fases iniciales de la enfermedad, pero si el animal sobrevive se atrofian durante las fases crónicas de la misma. Cuando se examinan histológicamente, se encuentran infiltraciones de linfocitos inmaduros en el pulmón, riñón, cerebro, hígado, bazo y ganglios linfáticos. Pueden encontrarse células parasitadas con esquizontes en frotis de improntas de todos los tejidos: pulmón, bazo, riñón y ganglios linfáticos son particularmente útiles para observar esquizontes. En casos de más larga duración, aparecen focos de infiltraciones linfocitarias de los riñones a modo de infartos blancos. En los animales que se recuperan pueden producirse recaídas ocasionales. En las

zonas endémicas de *T. parva* se observa, a veces, un síndrome nervioso denominado teileriosis cerebral, y se considera que se encuentra asociado a la presencia de agregados intravasculares y extravasculares de linfocitos infectados por esquizontes, causando trombosis y necrosis isquémica en el cerebro.

En *T. annulata*, tanto las fases de esquizonte como de piroplasma pueden ser patógenas. Los esquizontes son escasos en la sangre periférica de los animales con enfermedad aguda y su presencia en los frotis sanguíneos indica un mal pronóstico. Sin embargo, es fácil observar esquizontes en los frotis de ganglios linfáticos, y de los tejidos del bazo y del hígado obtenidos mediante biopsia con aguja. Las lesiones anatomopatológicas macroscópicas causadas por los esquizontes de *T. annulata* recuerdan a las de *T. parva*, mientras que la anemia y la ictericia son rasgos causados por esquizontes y por piroplasmas. Las cepas patógenas de *T. mutans* también producen anemia, al igual que cepas de Japón y Corea, denominadas *T. sergenti*.

Los piroplasmas de la mayoría de las especies de *Theileria* pueden persistir durante años o meses en los animales recuperados, y pueden detectarse de manera intermitente en exámenes posteriores. Sin embargo, los resultados negativos del examen microscópico de los frotis de sangre no excluyen una infección latente. Puede inducirse la recaída en la parasitemia por algunas especies de *Theileria* mediante la esplenectomía. En los frotis de impresión post-mortem también se observan piroplasmas, aunque los parásitos parecen encogidos y su citoplasma apenas es visible.

1.2. Métodos moleculares

Los primeros métodos moleculares basados en ADN para detectar especies de *Theileria* se basaron en la inmunoelectrotransferencia con distintos tipos de sondas, derivadas de secuencias de genes de ARN ribosómico, para detectar todas las especies de *Theileria* que se sabe que infectan al ganado bovino (Allsopp *et al.*, 1993; Bishop *et al.*, 1995). También se desarrollaron sondas de ADN específicas de *T. parva* (Allsopp y Allsopp, 1988; Conrad *et al.*, 1987; Morzaria *et al.*, 1999a) y *T. mutans* (Morzaria *et al.*, 1989). Los métodos de inmunoelectrotransferencia han sido suplantados en gran medida por protocolos de PCR específicos de especie diseñados para detectar ganado portador de *T. annulata* y *T. parva* (Bishop *et al.*, 1992; D'Oliveira *et al.*, 1995; Odongo *et al.*, 2010; Skilton *et al.*, 2002). También se han desarrollado varias PCR utilizando genes específicos o secuencias de satélite para la caracterización de diferentes cepas y clones de *T. parva* (Geysen *et al.*, 1999, Oura *et al.*, 2003, Patel *et al.*, 2011).

Se ha introducido una prueba de transferencia lineal inversa (RLB) basada en la hibridación de productos de PCR a sondas de oligonucleótidos específicas inmovilizadas en una membrana para la detección simultánea de diferentes especies de *Theileria* (Gubbels *et al.*, 1999), así como pruebas en tiempo real basadas en la técnica FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) para el diagnóstico específico de *T. parva* (Sibeko *et al.*, 2008).

Las secuencias de cebador y sonda para varios de estos ensayos se presentan en la Tabla 2, junto con las condiciones de ciclado para la PCR anidada p104, muy utilizada, para *T. parva*.

La amplificación por PCR de los genes p33/34 del complejo *T. orientalis/buffeli* seguida del análisis mediante enzimas de restricción puede emplearse para caracterizar distintos tipos (Kawazu *et al.*, 1992; Kubota *et al.*, 1995).

Tabla 2. Cebadores y sondas de la PCR para la detección de *T. annulata* o *T. parva*

Gen diana	Secuencias de los cebadores	Secuencias de las sondas	Referencia
<i>T. annulata</i>			
Proteína de 30 kDa	GTA-ACC-TTT-AAA-AAC-GT GTT-ACG-AAC-ATG-GGT-TT	n/a	D'Oliviera <i>et al.</i> , 1995

Gen diana	Secuencias de los cebadores	Secuencias de las sondas	Referencia
<i>T. parva</i>			
p104	ATT-TAA-GGA-ACC-TGA-CGT-GAC-TGC TAA-GAT-GCC-GAC-TAT-TAA-TGA-CAC-C	n/a	Skilton <i>et al.</i> , 2002
p104 (anidada)	PCR primaria: ATT-TAA-GGA-ACC-TGA-CGT-GAC-TGC TAA-GAT-GCC-GAC-TAT-TAA-TGA-CAC-C PCR secundaria: GGC-CAA-GGT-CTC-CTT-CAG-ATT-ACG TGG-GTG-TGT-TTC-CTC-GTC-ATC-TGC Condiciones de ciclado: Primaria: <ul style="list-style-type: none"> • 94°C durante 1 minuto • 40 ciclos de 94°C/1 minuto, 60°C/1 minuto, 72°C/1 minuto • 72°C durante 9 minutos tras el último ciclo. Secundaria: <ul style="list-style-type: none"> • 94°C durante 1 minuto • 30 ciclos de 94°C/1 minuto, 55°C/1 minuto, 72°C/1 minuto • 72°C durante 9 minutos tras el último ciclo 	n/a	Odongo <i>et al.</i> , 2010.
ARN de 18S (RLB)	GAG-GTA-GTG-ACA-AGA-AAT-AAC-AAT-A TCT-TCG-ATC-CCC-TAA-CTT-TC	TTC-GGG-GTC-TCT-GCA-TGT	Gubbels <i>et al.</i> , 1999
ARN de 18S (FRET)	CTG-CAT-CGC-TGT-GTC-CCT-T ACC-AAC-AAA-ATA-GAA-CCA-AAG-TC	GGG-TCT-CTG-CAT-GTG-GCT TAT-F LCRed640-TCG-GAC-GGA-G TTC-GCT-PH	Sibeko <i>et al.</i> , 2008

2. Pruebas serológicas

2.1. Prueba de la inmunofluorescencia indirecta

La prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFA) es la más ampliamente utilizada para el diagnóstico de *Theileria* sp. La IFA es robusta, fácil de realizar y proporciona una sensibilidad y una especificidad suficientes para su uso, a nivel de campo, en la detección de infección previa por *T. parva* y *T. annulata* en situaciones experimentales y en un entorno epidemiológico definido en el que solo haya especies de *Theileria*. La prueba IFA tiene limitaciones para los estudios serológicos a gran escala debido a su baja especificidad en situaciones de campo en las que coexistan varias especies de *Theileria*. Se precisan pruebas más específicas, fáciles de interpretar y lo suficientemente robustas como para usarse en condiciones de campo.

2.1.1. Preparación del antígeno de esquizonte

i) Portas con antígeno de esquizonte

Los antígenos utilizados para la IFA son los esquizontes intracitoplasmáticos derivados de líneas celulares linfoblastoides infectadas en el caso de *T. parva*, y de líneas celulares de los macrófagos infectados en el caso de *T. annulata*.

Se centrifugan a 200 *g* durante 20 minutos a 4°C cultivos de entre 200 ml y 1 litro de células infectadas con esquizontes de *T. parva* o *T. annulata*, en los que al menos un 90% de las células se encuentran infectadas. Se retira el líquido sobrenadante, y el precipitado

celular se resuspende en 100 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría (4°C), pH 7,2–7,4, y se centrifuga como antes. Este proceso de lavado se repite tres veces y, después del lavado final, se resuspende el precipitado en PBS (aproximadamente 20–100 ml) para alcanzar una concentración final de 10^7 células/ml.

Utilizando un molde o punta de pipeta, se depositan capas de la suspensión celular sobre portas de pocillos múltiples recubiertos con Teflón o en portas ordinarios empleando o laca de uñas para su separación. Los frotis deben proporcionar entre 50 y 80 células intactas por campo visual cuando se examinan con un objetivo de 40×. Los antígenos se reparten sobre los portas utilizando una pipeta multicanal o una pipeta de 100 µl. Dispensando y aspirando inmediatamente la suspensión de esquizontes, queda una monocapa de esquizontes en cada pocillo. Este procedimiento se realiza para cada pocillo hasta que se agota el volumen. Con este método pueden obtenerse aproximadamente 600 portas de buena calidad, que contienen un total de 6.000 puntos antigénicos. Los frotis se secan al aire, se fijan en acetona durante 10 minutos, se envuelven individualmente en papel absorbente y, a continuación, en grupos de cinco en papel de aluminio, y se almacenan en contenedores de plástico herméticos e impermeables al agua a –20 o a –70°C. Los antígenos se conservan durante al menos 1 año a –20°C, y durante más tiempo a –70°C.

ii) Antígeno de esquizonte en suspensión

Primero se centrifugan 500 ml de células infectadas por *T. parva* o *T. annulata* que contengan 10⁶ células/ml a 200 g durante 10 minutos a 4°C, y el precipitado celular obtenido se lava dos veces en 100 ml de PBS frío. La viabilidad de las células se determina con eosina o exclusión con azul tripan (debe ser superior al 90%). Las células se resuspenden a 10^7 /ml en PBS fría. A este volumen se le añaden gota a gota dos volúmenes de una solución de fijación fría que contenga un 80% de acetona y formaldehído al 0,1% (0,25% de formalina) en PBS, mientras la suspensión celular se remueve lentamente y de manera continua en un baño de hielo. La suspensión celular se mantiene a –20°C y se fija durante 24 horas. Se extraen con sifón alrededor de 2/3 del volumen, se centrifuga y se decanta. A continuación, las células fijadas se lavan tres veces en solución salina fría y se centrifugan a 200–400 g durante 20 minutos a 4°C. Después del último lavado, las células se resuspenden en 5 ml de PBS + BSA (seroalbúmina bovina) al 0,2% a razón de 10^7 /ml. Las células fijadas se distribuyen en alícuotas de 0,5 ml. El antígeno con un 0,2% de azida sódica es estable a 4°C durante 2 semanas, y se mantiene estable indefinidamente a –20°C. Este método también se puede utilizar para preparar antígeno de esquizonte de *T. taurotragi*.

2.1.2. Preparación del antígeno de piroplasma

La etapa de piroplasma de *Theileria* spp. no puede mantenerse en cultivo, por lo tanto, el antígeno del piroplasma debe prepararse a partir de sangre de los animales infectados. Debe prestarse la debida atención al principio de “Las tres R”, tal como se establece en el Código Terrestre de la OIE, Capítulo 7.8 *Uso de animales en investigación y educación*.

i) Portas con antígeno de piroplasma

Las infecciones experimentales se inducen infectando por vía subcutánea al ganado vacuno con esporozoítos, o aplicando garrapatas infectadas por *T. parva*, *T. annulata* o *T. taurotragi*. La infección por *T. annulata* se produce siempre mediante la inoculación de sangre de ganado infectado por teileriosis aguda. La esplenectomía del ganado receptor antes de la infección aumenta considerablemente la parasitemia por piroplasmas en los eritrocitos. Los picos de parasitemias presentan una duración corta y, si los animales sobreviven a la enfermedad, el porcentaje de eritrocitos infectados disminuye considerablemente en pocos días. Las infecciones por el grupo de parásitos denominado *T. orientalis/buffeli*, *T. mutans* o *T. velifera* se inducen, generalmente, inoculando por vía intravenosa a ganado vacuno esplenectomizado sangre de un animal portador, o bien un estabilizado de sangre, o mediante la aplicación de garrapatas infectadas. Cuando la parasitemia por piroplasmas es del 10% o superior, se extraen 100 ml de sangre infectada de la vena yugular con vacutainer que contenga heparina o ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), y se mezclan cuidadosamente con 2 litros de PBS. La mezcla se

centrifuga a 500 *g* durante 10 minutos a 4°C; se retiran el plasma y la capa de leucocitos, los eritrocitos se resuspenden de nuevo en 2 litros de PBS, y se repite el paso de la centrifugación. Es importante retirar la capa de leucocitos después de cada lavado. Este procedimiento de lavado se repite cuatro veces. Después del lavado final, se utiliza una alícuota de los eritrocitos concentrados para preparar diluciones seriadas a la mitad en PBS, y se coloca una gota de 5 µl de cada dilución sobre los portas. Las gotas secas se fijan con metanol, se tiñen con colorante Giemsa, y se examina la concentración de los eritrocitos empleando un microscopio de campo claro. Se selecciona entonces la dilución que proporciona una monocapa de eritrocitos dispuestos uniformemente en la gota, para la preparación a gran escala de portas con antígeno de piroplasma. Se pueden preparar aproximadamente 10.000 portas de antígeno (100.00000 puntos antigénicos) a partir de 100 ml de sangre infectada. Los frotis con antígeno se dejan secar a temperatura ambiente antes de fijarlos en acetona fría (4°C) durante 10 minutos. Los frotis fijados pueden almacenarse de la misma forma que los portas con los antígenos de esquizonte, y mantenerse durante un tiempo similar.

ii) Antígeno de piroplasma en suspensión

Se encuentra disponible un método alternativo al descrito anteriormente para la preparación de antígenos, y ha sido probado con *T. parva*. En este procedimiento, se recogen 100 ml de sangre de una animal con una alta parasitemia por piroplasmas y se preparan como se ha descrito previamente, y el volumen de células concentradas se ajusta al 5% con PBS.

Se añade un volumen de la suspensión de eritrocitos a dos volúmenes de líquido de fijación (véase el apartado 2.1.1.ii, arriba) mientras se remueve. Las células se dejan fijar a -20°C durante 24 horas. A continuación, las células fijadas se lavan tres veces con PBS y se centrifugan a 1.000 *g* durante 30 minutos. El sedimento se resuspende hasta el volumen original de sangre con PBS que contenga un 0,2% de azida sódica y se distribuye en alícuotas de 0,5 ml.

El antígeno de piroplasma es estable a 4°C, cuando se conserva con azida sódica al 0,2%, durante un periodo de al menos 3 años.

2.1.3. Estandarización del antígeno

Las suspensiones de antígeno de esquizonte y piroplasma se mezclan en un mezclador rotatorio y se titulan en PBS mediante dilución a la mitad comenzando a partir de la muestra sin diluir hasta la dilución 1/16. La dilución recomendada para el uso de ese lote de antígeno es la que proporciona una distribución celular de aproximadamente 50–80 células infectadas por esquizontes, o 150–200 de eritrocitos infectados por campo visual cuando se examinan con una lente con objetivo 40×. Cuando se emplea esta dilución se preparan los frotis de antígeno sobre portas. Estos frotis de antígeno, más los portas con antígeno congelados previamente (y descongelados antes de usarse) se comprueban frente a una gama de diluciones de un grupo de sueros control fuertemente positivos, intermedios, débilmente positivos, y negativos. El antígeno se utiliza en IFA de rutina si los sueros control positivos son titulados hasta su título conocido y los sueros negativos control no producen fluorescencia.

En muchos laboratorios se utilizan rutinariamente ambos tipos de preparaciones de antígeno, los frotis fijados con acetona almacenados a -20°C o -70°C, y los antígenos en suspensión fijados y almacenados a 4°C o -20°C. La sensibilidad de ambos tipos de antígenos es parecida. Los portas con antígenos pueden utilizarse en los laboratorios que disponen de instalaciones para almacenamiento a baja temperatura y una fuente segura de electricidad. Sin embargo, tales antígenos solamente pueden transportarse en hielo seco o nitrógeno líquido. Los antígenos fijados en suspensión tienen la ventaja, respecto a los portas con antígeno, de que el método inicial de preparación es más simple y rápido. Puede almacenarse un lote grande de este antígeno en un contenedor y tomarse las alícuotas cuando sea necesario, a partir de las cuales se preparan frotis frescos para la IFA. Se evita, por lo tanto, la necesidad de una instalación de almacenamiento de gran tamaño. Los antígenos fijados en suspensión también pueden almacenarse a 4°C y pueden transportarse a temperatura ambiente sin pérdida de antigenicidad.

2.1.3.1. Preparación del lisado de linfocitos bovinos

Se prepara un lisado de linfocitos de acuerdo con el método descrito por Goddeeris *et al.* (1982) para su empleo en las pruebas con antígenos de *T. parva* en suspensión. Para explicarlo de forma resumida, se esplenectomiza un ternero de 3 meses y se mantiene en un entorno sin garrapatas. Para excluir la posibilidad de una infección latente por teileriosis, se examinan a diario y durante 4 semanas frotis de la sangre del animal teñidos con el método de Giemsa, para comprobar si presentan parásitos. Se sacrifica el animal libre de parásitos y se extraen el timo y todos los ganglios linfáticos accesibles. Estos tejidos se cortan en pedacitos en PBS frío que contenga un 0,45% de EDTA como anticoagulante. Se extraen las células del tejido, y se separan del resto pasándolas a través de un paño de muselina, y se lavan tres veces con PBS/EDTA mediante centrifugación a 200 *g* durante 20 minutos a 4°C. Los linfocitos lavados se resuspenden en PBS sin EDTA hasta dar una concentración final de 5×10^7 células/ml. Las células se destruyen mediante sonicación en alícuotas de 100 ml en hielo durante 5 minutos empleando la sonda de 3/8. El material sonicado se centrifuga a 1.000 *g* durante 30 minutos a 4°C y el sobrenadante, ajustado a 10 mg proteína/ml, se almacena a -20°C en alícuotas de 4 ml.

2.1.3.2. Procedimiento analítico

- i) Con antígeno de esquizonte o piroplasma en porta
 - a) Se extraen del congelador los portas con antígenos y se dejan descongelar durante 30 minutos a 4°C y 30 minutos a temperatura ambiente.
 - b) El suero que se ha de analizar se inactiva 30 minutos en un baño maría a 56°C
 - c) Se desembalan los portas y se etiquetan los números de los sueros problema.
 - d) Se preparan diluciones a 1/40 y 1/80 de los sueros problema. En cada prueba se incluyen sueros problema positivos y negativos validados. Se pueden hacer más diluciones a la mitad si se desean los títulos de anticuerpos a punto final.
 - e) Se transfieren 25 μ l de cada dilución de suero a un punto de antígeno.
 - f) Se incuban en una cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente.
 - g) Se extraen las muestras de suero de los pocillos de antígeno lavando con PBS y se aclara de por inmersión consecutiva en dos cubetas de tinción con PBS durante 10 minutos cada vez.
 - h) Se distribuyen a cada pocillo 20 μ l de solución anti inmunoglobulina bovina conjugada con isotiocianato de fluoresceína a una dilución apropiada (generalmente son adecuadas las diluciones recomendadas por los fabricantes; sin embargo, pueden ser necesarios pequeños ajustes para obtener resultados óptimos). Se incorpora azul Evans al conjugado a una dilución final de 1/10,000 como tinción de contraste y se incuban en una cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente.
 - i) Se repite el paso g) y se monta con un cubreobjetos en una gota de PBS/glicerol (50% de cada).
 - j) Se examinan los portas en un microscopio de fluorescencia equipado con iluminación epi-Koem (lámpara de mercurio de 100 W), filtro de UV, oculares $\times 6,3$ y objetivo de inmersión Phaco FL 40/1,3.
- ii) Con antígeno de esquizonte almacenado en suspensión
 - a) Se descongela el antígeno a temperatura ambiente.
 - b) Se distribuye la suspensión del antígeno en los puntos de los portas de múltiples puntos empleando una pipeta multicanal o de 100- μ l. Dispersando y aspirando inmediatamente la suspensión, queda en cada pocillo una monocapa de células infectadas por el esquizonte.
 - c) Se dejan secar las preparaciones a temperatura ambiente o a 37°C.

- d) Se diluyen los sueros problema y control a 1/40 en lisado de linfocitos (195 µl de lisado de linfocitos + 5 µl de suero).
 - e) Se continúa como se describe en los pasos e) a j) (apartado 2.1.3.2.i).
- iii) Con antígeno de piroplasma almacenado en suspensión
- a) Se resuspende el antígeno de piroplasma (almacenado a 4°C) por agitación y se dispensan los eritrocitos pasando la suspensión a través de una aguja de 25G para romper los agregados.
 - b) Se diluye el antígeno a diluciones previamente estandarizadas (véase la preparación del antígeno de piroplasma).
 - c) Se dejan secar las preparaciones a temperatura ambiente o a 37°C
 - d) Se continúa como se describe en los pasos d) y e) (apartado 2.1.3.2.ii).

2.1.4. Características de la prueba de la inmunofluorescencia indirecta

La incorporación del azul Evans proporciona un buen contraste, haciendo fácil la diferenciación entre las células infectadas y las no infectadas mediante microscopía de fluorescencia. El montaje de los portas en glicerol al 50% a pH 8,0 reduce la pérdida rápida de intensidad del FITC y permite fotografiar la preparación. Los portas son estables una vez preparados, y pueden leerse hasta 72 horas después de la preparación cuando se mantienen en la oscuridad a 4°C.

La sensibilidad de la IFA depende del período transcurrido tras la infección. Tras la infección por esporozoítos, se empiezan a detectar anticuerpos frente a *T. parva* y *T. annulata* entre los días 10 y 14 utilizando el antígeno de esquizonte. Empleando el antígeno de piroplasma, los anticuerpos se empiezan a detectar entre los días 15 y 21. Los anticuerpos duran un periodo de tiempo variable después de la recuperación, dependiendo de factores tales como el establecimiento de la fase de portador, la intervención quimioterápica y si el animal vuelve a estar o no expuesto al agente. Después de la recuperación de una infección por *T. parva* o *T. annulata*, se detectan niveles altos de anticuerpos generalmente durante 30 a 60 días. Los niveles de anticuerpos descienden gradualmente y todavía pueden detectarse a un nivel bajo a los 4–6 meses de la recuperación. Después, los anticuerpos pueden ser indetectables a una dilución 1/40, aunque pueden persistir durante más de un año después de una sola estimulación. En regiones endémicas de FCE, la seroprevalencia en la población de ganado vacuno fluctúa considerablemente dependiendo del nivel y regularidad del estímulo. En una zona endémica donde se produce un ciclo estacional de transmisión de la FCE, se ha observado que la IFA carece de sensibilidad. Se ha observado que la sensibilidad diagnóstica global de la IFA es del 55% a un título de corte de 1/40, y del 28% a 1/160. La especificidad de la prueba para los dos puntos de corte fue de 86% y 95%, respectivamente (Billiouw *et al.*, 2005).

La IFA es útil para identificar los rebaños con portadores de *T. annulata*, pero no siempre es lo bastante sensible como para detectar a todos los individuos infectados. En algunos animales, a pesar de ser presentar una infección manifiesta por piroplasmas, la IFA de detección de anticuerpos ha fracasado tanto al utilizar antígenos de esquizonte como de merozoíto (piroplasma) (Darghouth *et al.*, 1996).

En las infecciones por *T. mutans* inducidas mediante la inoculación con esporozoítos, los anticuerpos se detectan por primera vez entre los días 10 y 15 tras la aparición de los piroplasmas. Se detectan títulos bajos durante al menos 12–24 meses.

La IFA para *T. parva* es muy sensible para detectar anticuerpos en una situación epidemiológica en la que solo existe una especie de *Theileria*. Sin embargo, si esta prueba se emplea para detectar anticuerpos cuando tienen lugar infecciones mixtas de *Theileria*, es necesario evaluar cuidadosamente la especificidad de la prueba. Por ejemplo, *T. annulata* y *T. parva* generan reacción cruzada, aunque estas reacciones cruzadas son cuatro a seis veces más bajas que con los sueros homólogos. La reacción cruzada entre las dos especies tiene poca importancia en la práctica, ya que la distribución geográfica de estos dos parásitos no se superpone. En la IFA no ocurre tal reactividad cruzada entre *T. parva* y *T. mutans* ni entre *T. annulata* y *T. mutans*. Existe

cierta reacción cruzada entre *T. parva* y *T. taurotragi*, lo cual reduce la especificidad de estas dos pruebas en muchas partes del África subsahariana donde se superpone su distribución.

Se ha generado un grupo de anticuerpos monoclonales (MAb) que detectan varios epítomos del antígeno polimórfico inmunodominante de la fase esquizonte de *T. parva*. Este grupo de MAb puede usarse en la IFA empleando células linfoblastoides infectadas por el esquizonte para detectar las diferencias entre ciertas cepas de *T. parva* y entre *T. parva* y otras especies de teilerias. Esta prueba se ha implementado como uno de los instrumentos de caracterización útiles para diferenciar varias cepas de *T. parva*, y para el control de calidad durante la preparación del estabilizado de esporozoito (Bishop et al., 1994).

2.2. Enzimoimmunoanálisis

Se han desarrollado pruebas serológicas basadas en el ELISA para detectar anticuerpos contra *T. annulata* (Gray et al., 1980). Las pruebas que se utilizan para detectar *T. parva* y *T. mutans* son ELISA indirectos en los que se emplean los antígenos específicos de parásito PIM y p32, respectivamente (Katende et al., 1998; Morzaria et al., 1999a). Estos ELISA proporcionan una sensibilidad más alta (superior al 95%) que las IFA. Los reactivos para el ELISA se venden en el *International Livestock Research Institute*, Nairobi, Kenia.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

C1. Vacunas de cultivos celulares vivos contra *Theileria annulata*

1. Antecedentes

Se ha intentado la vacunación contra *T. parva* y *T. annulata* desde que fueron descubiertas a principios del siglo pasado. Sin embargo, las vacunas vivas seguras y de potencia conocida son de elaboración mucho más reciente. Las más utilizadas son las vacunas de cultivos celulares de esquizontes atenuados contra *T. annulata*. Se han descrito los procedimientos para la producción y las pruebas de seguridad (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 1984; Hashemi-Fesharki, 1988; Pipano, 1989b), y la vacuna se utiliza mucho en Israel, Irán, Turquía, España, India, el norte de África, Asia central y la República Popular de China.

Pese a que la vacunación con la vacuna de cultivo celular contra *T. annulata* ha estado disponible durante más de tres décadas y se ha mostrado eficaz en condiciones de campo, su uso ha sido limitado. La preocupación de introducir parásitos derivados de la vacuna en la población de garrapatas en condiciones de campo ha llevado a algunos países a desarrollar vacunas con cepas locales (Morisson & Mc Keever, 2006). Algunas líneas celulares atenuadas han perdido la capacidad de diferenciarse para convertirse en merozoítos eritrocíticos (piroplasmas) cuando se inoculan al ganado vacuno, y, en un caso, las ninfas de *Hyalomma* que se alimentaron en ganado vacunado no se infectaron (Kachani et al., 2004a). Sin embargo, en la mayoría de los casos, la pérdida de esa diferenciación se basa en análisis macroscópicos de extensiones de sangre de ganado al cual se ha inoculado la vacuna. Este inconveniente, junto con las dificultades de estandarización de la composición antigénica de los parásitos cultivados y la necesidad de una cadena de frío para la distribución de la vacuna al campo, son los factores que limitan la comercialización de esta vacuna (Morisson & Mc Keever, 2006).

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

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

Pueden establecerse cultivos primarios de células infectadas por *T. annulata* a partir de ganglios linfáticos, hígado o bazo tripsinizados obtenidos asépticamente a partir de un animal infectado después de que muera, a partir de la capa leucocitaria de sangre periférica heparinizada separada en un gradiente de densidad (Ficoll Hypaque), o utilizando linfocitos recogidos de una biopsia de ganglios linfáticos, con el método de la jeringa de plástico (Brown, 1979; FAO, 1984).

Se preparan cultivos del inóculo a partir de líneas celulares crioprotegidas que se han aislado de ganado vacuno y han sido atenuadas como se describe más adelante. Las vacunas deben producirse a partir de un cultivo de inóculo (inóculo primario) que tenga menos de 30 pases, pues existe alguna duda sobre la estabilidad inmunógena de estos cultivos durante los pases a largo plazo.

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

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario se hallan en el capítulo 1.1.9. Dado que el material del cultivo celular deriva de animales de campo, sus células podrían llegar a contaminar la vacuna. Los posibles agentes contaminantes son los causantes de la leucosis bovina, la micoplasmosis, la diarrea viral bovina y la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), entre otras bacterias y virus.

La contaminación cruzada por células en cultivos celulares es un problema frecuente durante el desarrollo y uso de los mismos, que puede resolverse advirtiendo del mismo siempre que sea posible e introduciendo controles regulares de calidad para comprobar si se ha producido dicha contaminación.

2.1.3. Validación como cepa vacunal

La atenuación de los esquizontes de *T. annulata* se logra mediante un crecimiento y pase prolongado en el cultivo celular (Pipano, 1989b). La pérdida de virulencia del parásito parece deberse a un cambio en la expresión génica del mismo. La atenuación se evalúa inoculando el cultivo a terneros susceptibles cada 20–30 pases. Debe conservarse en frío una muestra del cultivo cada diez pases, por si se pierde o contamina accidentalmente. La atenuación completa se logra cuando los cultivos no causan fiebre ni dan lugar a la presencia de esquizontes ni piroplasmas detectables en el ganado vacuno susceptible, pero ello puede suponer hasta 300 pases. Un cultivo atenuado infectará de manera fiable al ganado vacuno con 10^5 células e inducirá una reacción serológica, y no producirá enfermedad con 10^9 células. Los cultivos se pueden crioproteger utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) o bien glicerol. Abajo se describen dos métodos de almacenamiento y entrega de la vacuna.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

Las células infectadas se cultivan inicialmente en el medio mínimo esencial de Eagle (MEM) o en el medio Leibovitz L15 con un suplemento de suero bovino al 20% y que contenga penicilina (100 unidades/ml), estreptomina (50 µg/ml) y micostatina (75 unidades/ml) en frascos de cultivo tisular de 25 ml con tapón de rosca. Un medio alternativo es el RPMI 1640 con suero bovino fetal al 10%, glutamina 2 mM, penicilina y estreptomina, y normalmente se emplea con cultivos establecidos. El medio se repone cada 3–4 días. La presencia de células libres brillantes y refringentes en el medio (mediante examen con un microscopio invertido o de contraste de fases) es indicativa de un cultivo celular infectado. Los cultivos pueden presentarse en monocapa o en suspensión. El pase se efectúa decantando el medio, añadiendo EDTA (verseno) al 0,025% durante 15 minutos a los cultivos en monocapa, dispersando las células, y contando y dispensando según el tamaño del frasco. Se introducen aproximadamente 10^6 células en los frascos de 25 cm², y, para los frascos más grandes, se usa la misma proporción de inóculo en 100–200 ml. La técnica general de cultivo es la descrita por Brown (1979).

El suero es esencial para el mantenimiento de estos cultivos, y se obtiene a partir de terneros de hasta 6 meses de edad, o de fuentes comerciales; antes de utilizarlo debe comprobarse si presenta toxicidad mediante tres pases en una línea celular establecida.

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

Antes de comenzar a producir la vacuna, se necesita un material para el inóculo con características conocidas (Pipano, 1997). Se distinguen tres tipos de material para el inóculo:

i) Inóculo primario:

Células infectadas por esquizontes a partir de un pase específico que han sido seleccionadas y almacenadas permanentemente, y, a partir de las cuales derivan todos los pases. El inóculo primario debe consistir en un único lote uniforme que se haya mezclado y dispuesto en recipientes como un lote. Como en el proceso de producción se utilizan células infectadas con esquizontes de *T. annulata*, el inóculo inicial también representa la reserva original de células (véase el capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*). Para preparar un inóculo primario, se propagan células infectadas por esquizontes que han demostrado ser seguras para el ganado vacuno, hasta obtener aproximadamente 5×10^8 células en un solo pase de cultivo. Las células se crioprotegen en aproximadamente 100 criotubos que contienen 5×10^6 células cada uno. Debe realizarse una prueba de viabilidad del inóculo primario una vez que se haya crioprotegido durante al menos 24 horas, reviviendo uno de los criotubos.

ii) Inóculo de trabajo

Células infectadas por esquizontes con un nivel de pase entre el inóculo primario y el inóculo de producción. Para preparar el inóculo de trabajo, se transfiere el contenido de un solo criotubo de inóculo primario a un tubo de centrifuga de 10 ml que contiene 8 ml de medio completo. El tubo se centrifuga a 600 *g* durante 15 minutos a 4°C, y el precipitado se transfiere a frascos de cultivo celular de 75 cm² que contienen 15–20 ml de medio. El medio se cambia al día siguiente y 4 días después las células se dispersan y se subcultivan en frascos más grandes. Después de 5–6 subcultivos, se dispone de un número de células infectadas suficiente para comenzar la fase de producción.

iii) Inóculo de producción

Para la preparación de un lote de la vacuna, se utilizan células infectadas por esquizontes de un nivel de pase específico sin una propagación posterior. El inóculo de producción se obtiene propagando grandes cantidades de células en cultivos en monocapa o suspensión. Los cultivos monocapa se cultivan en frascos de 150 cm² a 175 cm² que normalmente proporcionan una media de 7×10^7 hasta 8×10^7 células por frasco. Se necesitan aproximadamente 80 ml de medio completo por frasco. En un sistema de cultivo de frascos rotatorios se pueden obtener $1,2\text{--}1,5 \times 10^8$ células en un frasco rotatorio convencional (700 cm²) que contienen 100–120 ml de medio. Para obtener un rendimiento óptimo de células, se incuban en cultivos estáticos o en frascos rotatorios durante 6–7 días con medio de cultivo como se ha descrito previamente, véase el apartado C1.2.2.1.

Se recogen y se juntan las células infectadas por esquizontes de todos los frascos y se computa su número total. Como alternativa, pueden sembrarse de nuevo aproximadamente un 20% de las células para preparar otro lote de vacuna. Pueden prepararse varios lotes de vacuna utilizando una porción del inóculo de producción como inóculo de trabajo. Como el cultivo prolongado puede provocar la alteración en las propiedades de los esquizontes, tales como la capacidad inmunógena, después de varios lotes la vacuna siguiente se produce preparando un inóculo de producción fresco a partir del inóculo primario.

Las células infectadas por esquizontes se mezclan con DMSO hasta una concentración final del 7% o en glicerol hasta una concentración final del 10%, y se distribuyen en viales de plástico de 2 ml en alícuotas de 1,8 ml, y cada vial contiene diez dosis de la vacuna concentrada. Como el DMSO penetra inmediatamente por las membranas celulares, el tiempo empleado en colocar la vacuna en los viales debe acortarse en la medida de lo posible. Cuando se emplea glicerol, se necesita un tiempo de estabilización de 30–40 minutos antes de congelar la vacuna. No existe consenso sobre cuántas células infectadas por esquizonte deben constituir una dosis de vacuna. Una aproximación práctica recomendada consiste en preparar dosis de $10^6\text{--}10^7$ células infectadas para contrarrestar las condiciones ambientales variables en el campo. Sin embargo, se ha logrado una considerable protección contra la infección inducida por esporozoíto vacunando con 10^5 células infectadas (Kachani *et al.*, 2004b).

La vacuna se congela introduciendo los viales en un ultracongelador (–70°C) y transfiriéndolos a recipientes con nitrógeno líquido 24 horas después. Como alternativa, los viales pueden introducirse en vapores de nitrógeno líquido durante 3 horas y a continuación sumergirse en

nitrógeno líquido para ser almacenados (Pipano, 1989b). La vacuna se transporta hasta el campo en nitrógeno líquido, y se diluye a 1/10 en solución salina isotónica tamponada en una botella con tapón de rosca con una tapa de goma o silicona, para que la extracción sea aséptica. Para diluir la vacuna congelada con glicerol, la solución salina isotónica tamponada debe contener también un 10% de glicerol para evitar el daño osmótico a los esquizontes. La vacuna se administra por vía subcutánea, como máximo 30 minutos después de la descongelación (Pipano, 1977).

El programa de vacunación en Irán consiste en la inoculación de dos dosis de vacuna preparadas a partir de dos cepas distintas y con un intervalo entre ambas de 30–60 días (Hashemi-Fesharki, 1988). En Marruecos se utiliza una vacuna de cultivo fresco, normalmente a una dosis decimal más baja (10^4 células infectadas por esquizontes) (Kachani et al., 2004b). Sin embargo, existen problemas con el control de calidad de las vacunas de vida media corta.

2.2.3. Controles durante el proceso

Deben mantenerse registros de la procedencia y del número de pases del material del inóculo de trabajo. Los inóculos deben estar libres de agente infectivos, como el virus de la leucosis bovina enzootica, el virus de la inmunodeficiencia bovina, el pestivirus bovino, el virus sincitial bovino, la fiebre del Valle del Rift, etc. Los procedimientos analíticos dependerán de la disponibilidad, pero preferiblemente deben utilizarse pruebas de ADN.

El pH, la temperatura y el color de las soluciones deben comprobarse durante el proceso, y las soluciones deben estar libres de contaminantes. En los cultivos celulares debe comprobarse a diario si hay contaminación, en qué cantidad y de qué tipo, examinándolos con un microscopio invertido.

2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad

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

ii) Precauciones relativas a la inocuidad

Las autoridades reguladoras no exigen pruebas de inocuidad en los animales de destino para la puesta en circulación de cada lote. Cuando son necesarias, generalmente se llevan a cabo procedimientos estándar utilizando menos animales que los utilizados en las pruebas de inocuidad requeridas para la aprobación por parte de las autoridades reguladoras correspondientes.

Los esquizontes de *Theileria annulata* no son peligrosos para el hombre ni contagiosos para los animales, y, por tanto, el principal propósito en el diseño de la producción de una vacuna debe ser evitar la contaminación del producto por microorganismos extraños.

a) Ausencia de propiedades que originen reacciones locales o sistémicas indebidas

Para comprobar la seguridad del inóculo primario se inoculan de dos a cuatro terneros susceptibles del lote más sensible disponible, con una dosis diez veces mayor que la recomendada para la vacunación. Esta dosis no debe producir signos clínicos más allá de un incremento transitorio en la temperatura. Con el inóculo primario completamente atenuado no se observarán esquizontes ni piroplasmas en frotis de ganglios linfáticos ni de hígado, ni en extensiones de sangre. Sin embargo, la sensibilidad frente a la vacuna puede variar en función de la raza. Esto debe tenerse en mente cuando se va a administrar la vacuna de un inóculo primario parcialmente atenuado a lotes de ganado vacuno de alta calidad.

Tras la prueba de inocuidad satisfactoria con una muestra, todos los lotes siguientes producidos a partir del mismo inóculo primario también pueden utilizarse sin repetir la prueba inocuidad. Sin embargo, si, a consecuencia de la vacuna, se detectan parásitos en la sangre o en los tejidos del ganado bovino vacunado en el campo o si aparecen signos

clínicos tras la inoculación, debe analizarse de nuevo el lote implicado u otro paralelo del mismo inóculo primario para comprobar si es seguro.

iii) Potencia del lote

En Israel, antes de liberar las vacunas preparadas con esquizontes, se analizan aplicando un procedimiento documentado (Pipano, 1989a).

Normalmente, la vacuna con esquizontes se produce en lotes individuales pequeños (3.000-5.000 dosis), lo cual hace que sea imposible analizar por completo cada lote, por motivos económicos. Se recomienda, por lo tanto, que en el primer lote de vacuna producido a partir de un inóculo primario se realicen pruebas de seguridad, eficacia, potencia y esterilidad, y que en los siguientes lotes se realicen solamente pruebas de esterilidad y de potencia. Esta recomendación se basa en el hecho de que, una vez atenuados los esquizontes cultivados, durante el cultivo posterior nunca se ha observado una reversión a la virulencia. En cuanto a la eficacia, durante el bajo número de pases (20–30) que se llevan a cabo al producir la vacuna en sí, nunca se ha observado ninguna alteración evidente de las propiedades inmunógenas.

a) Viabilidad de las células infectadas por esquizontes

La prueba de potencia se lleva a cabo por métodos cuantitativos *in vitro*. La vacuna congelada permanece estable durante el periodo de almacenamiento, incluso si este es prolongado, pero durante los procesos de congelación y descongelación se produce cierta pérdida de la viabilidad. La viabilidad debe comprobarse en condiciones lo más similares posible a las que se den cuando la vacuna se utilice en el campo. Por ello, la vacuna debe descongelarse, y la suspensión diluida de células infectadas por esquizontes debe dejarse a temperatura ambiente durante 60 minutos antes de proceder a las pruebas de viabilidad. Una prueba sencilla para evaluar la viabilidad de las células infectadas es el contaje basado en la exclusión del colorante nigrosina (Wathanga *et al.*, 1986). La vacuna que, una vez descongelada, diluida y dejada a temperatura ambiente durante 1 hora, sigue conteniendo un 50% o más de células vivas puede liberarse para que sea utilizada, aunque en la mayoría de los casos se halla un 80-90% de células vivas.

La viabilidad de los esquizontes también influye en la eficiencia de la siembra de las células infectadas por esquizontes (Wathanga *et al.*, 1986), puesto que solo las células que contienen esquizontes viables se multiplicarán. Por este motivo, la vacuna diluida descongelada se transfiere del frasco a un tubo de centrifuga. Se toma una muestra para el contaje y la suspensión se centrifuga durante 15 minutos a 600 *g*. Mientras, se determina el número total de células (vivas y muertas) para asegurarse de que la vacuna congelada tenía la concentración celular inicial necesaria. Tras la centrifugación, se desecha el sobrenadante y las células se vuelven a suspender hasta el volumen original empleando medio de cultivo completo. Se llevan a cabo diluciones decimales de células en medio completo en tubos estériles de 10 ml, de tal modo que las dos últimas diluciones contengan 50 y 5 células/ml, respectivamente. Se introducen doce réplicas de 200 μ l de cada una de las dos última diluciones en una placa de cultivo de 96 pocillos. Las placas se incuban a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y los cultivos se comprueban con un microscopio invertido los días 6 y 9 tras la inoculación. Se cuenta el número de pocillos que teóricamente contienen 1 célula en los cuales se observe crecimiento. La vacuna que presente una eficiencia de siembra <2 (células) es adecuada para ser utilizada en condiciones de campo.

2.3. Requisitos de autorización/registro/licencia

2.3.1. Proceso de fabricación

Para el registro de una vacuna, deben presentarse a las autoridades todos los datos relativos a la fabricación y a las pruebas de control de calidad de la misma (véanse los apartados C.2.2.1 y C.2.2.2). Esta información debe corresponder a tres lotes de vacuna consecutivos de un volumen no inferior a 1/3 del volumen habitual de un lote industrial.

2.3.2. Requisitos de inocuidad

i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

Los esquizontes de *Theileria annulata* no son contagiosos en los animales. Estas vacunas no causan efectos adversos en ganado vacuno sano. No obstante, cuando existen infecciones, sobre todo víricas, es posible que los animales no toleren bien la vacunación. No se recomienda administrar vacunas víricas, como la de la fiebre aftosa, durante el periodo de inmunización (periodo de reacción) porque la respuesta inmunitaria podría resultar comprometida (Hashemi-Fesharki, 1988). En Irán, no se recomienda vacunar a las vacas que hayan superado los 5 meses de gestación, aunque en ciertos estudios realizados en Israel sobre cepas de la vacuna utilizada en vacas gestantes no hallaron ningún efecto en la gestación (Pipano, 1989a). La inmunidad que se genera es muy duradera.

En general, el ganado vacuno debe vacunarse durante los primeros meses de vida, y la exposición a garrapatas en condiciones naturales refuerza la inmunidad. Aunque se han identificado varias cepas de *T. annulata* antigénicamente distintas (Pipano, 1977), en general se considera que hay suficiente protección cruzada entre cepas como para proporcionar una protección suficiente contra la exposición a cepas naturales, como se observó en Israel. En las inmensas zonas infectadas de Asia central, se ha observado que una sola cepa vacunal ha bastado para conseguir efectividad inmunológica en 1,5 millones de reses (Dolan, 1989; Wathanga *et al.*, 1986). No obstante, como se ha descrito previamente, en Irán por rutina se utilizan dos cepas vacunales (Hashemi-Fesharki, 1988).

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

Una vez los esquizontes cultivados están atenuados, nunca se ha observado que se produzca reversión a la virulencia durante el cultivo posterior.

iii) Precauciones (peligros)

Es posible que la sensibilidad del ganado vacuno a la vacuna varíe en función de la raza, y es algo que debe tenerse en cuenta al administrar una vacuna derivada de un inóculo primario parcialmente atenuado a poblaciones de ganado vacuno de gran valor.

2.3.3. Requisitos de eficacia

i) Capacidad para proteger frente a la teileriosis transmitida de forma natural

El lote de la vacuna experimental utilizado para la prueba de inocuidad también puede utilizarse para comprobar la eficacia de la vacuna anti-*Theileria* derivada de cultivo. Se vacunan tres o cuatro terneros con una dosis convencional de vacuna, y 6 semanas más tarde los terneros vacunados y el mismo número de terneros no vacunados se infectan con esporozoítos de *T. annulata*. La infección puede inducirse mediante garrapatas adultas vivas derivadas de fases preimaginales infectadas por *T. annulata*, o mediante la inoculación del estabilizado preparado a partir de garrapatas infectadas maceradas (véanse las técnicas en el apartado C2.2). La experiencia muestra que la inoculación del estabilizado (garrapatas maceradas) induce generalmente una respuesta más grave que un número equivalente de garrapatas vivas infectadas a las que se les permite alimentarse en las reses. Sin embargo, a largo plazo, los resultados obtenidos mediante la sensibilización con el estabilizado parecen ser más reproducibles que los obtenidos con diferentes lotes de garrapatas vivas.

No existen normas acordadas internacionalmente sobre el tamaño de la dosis de sensibilización utilizada para comprobar la eficacia de la vacuna derivada del cultivo de *T. annulata*. Se han empleado de cinco a diez hembras y el mismo número de machos de garrapatas infectadas por *Hyalomona* sin alimentar para la infección del ganado vacuno. De manera alternativa, un estabilizado equivalente a 2–4 garrapatas maceradas inoculadas por vía subcutánea en la zona del cuello producirá siempre una teileriosis aguda. Para el seguimiento de las respuestas frente a la infección de los terneros control vacunados y no vacunados se siguen empleando los siguientes parámetros: la duración e intensidad de la pirexia, el porcentaje de células infectadas por esquizontes en frotis de

ganglio linfático o de biopsia hepática, el porcentaje de infección de eritrocitos por piroplasmas en extensiones de sangre, la disminución en el recuento de eritrocitos y de leucocitos, y la intensidad de signos clínicos tales como anorexia, abatimiento y postración.

Los resultados de la prueba de eficacia dependen de factores tales como las características inmunológicas de la cepa aislada de *T. annulata* cultivada y atenuada en cultivo, la virulencia y dosis de la cepa de campo utilizada para la sensibilización y las especies de garrapatas infectadas utilizadas para producir esporozoitos. Ciertos estudios de investigación (Pipano, 1989b) muestran que los terneros vacunados con la vacuna de esquizontes pueden presentar aparentemente una protección casi total, o bien un nivel bajo de parasitemia, acompañada de fiebre moderada y una alteración insignificante del resto de los parámetros respecto a los valores previos a la vacunación después de un estímulo homólogo potencialmente letal. Cuando el ganado vacunado con la vacuna de esquizontes se sensibilizó con parásitos derivados de garrapatas de una zona geográficamente apartada, se observó un grado de protección menor. Por el contrario, los terneros control no vacunados presentaron un nivel alto de parasitemia y pancitopenia en la mayoría de los ensayos, acompañado de signos clínicos graves. En ausencia de una medicación específica, la mayoría de los animales control sucumbieron a la infección (Pipano, 1989b).

Para evaluar la eficacia de las vacunas anti-*Theileria* también se han utilizado observaciones de campo (Pipano, 1989a; Stepanova & Zablotskii, 1989). El ganado vacuno autóctono susceptible, así como razas exóticas de alta calidad, fueron protegidos frente a la teileriosis clínica y la muerte en los pastos en los que el ganado no vacunado sucumbió a la teileriosis. Como la vacuna de esquizontes totalmente atenuada no produce piroplasmas, la presencia de esta fase de la teileria en el ganado vacunado que no muestra signos clínicos se considera que es el resultado de una infección subclínica inducida por garrapatas.

La vacuna congelada se mantiene viable en grandes contenedores de nitrógeno líquido en las instalaciones de producción y se transporta a las explotaciones en recipientes con nitrógeno líquido más pequeños. Se pueden establecer centros de campo para el almacenamiento y la distribución de la vacuna en áreas enzoóticas de teileriosis. El equipo básico necesario para la aplicación en el campo de la vacuna congelada incluye una jarra de boca ancha para preparar un baño de agua a 40°C, un termómetro para medir la temperatura del agua, pinzas largas, protección facial y guantes termorresistentes. La aplicación de la vacuna congelada comienza con el uso de la protección facial y los referidos guantes. Con las pinzas se retira el número de viales requerido del recipiente de nitrógeno líquido. Al realizar esta operación, el bote debe exteriorizarse lo mínimo indispensable del refrigerador para evitar el rápido calentamiento del resto de los viales. Cada vial extraído debe examinarse para comprobar que no ha penetrado dentro el nitrógeno líquido que, aunque no altera la vacuna, puede causar la explosión del vial cuando se introduce en el baño de agua. Los viales deben mantenerse a temperatura ambiente 1-2 minutos para favorecer el escape del nitrógeno líquido, y luego se procesan del modo habitual. El pase de nitrógeno líquido al vial que contiene la vacuna ha planteado interrogantes sobre la esterilidad de la vacuna congelada. Sin embargo, el sistema se ha empleado durante décadas sin que se hayan observado problemas destacables. La vacuna se administra por vía subcutánea dentro de los primeros 30 minutos después de la descongelación (Pipano, 1977).

2.3.4. Duración de la inmunidad

Se han obtenido resultados muy variables en cuanto a la duración de la inmunidad derivada de la vacunación con la vacuna de cultivo celular. Se han observado duraciones que van desde más de 48 meses (Stepanova & Zablotskii, 1989) a menos de 13 meses (Ouelli et al., 2004)

2.3.5. Estabilidad

La vacuna congelada tiene un periodo de validez prácticamente ilimitado.

C2. Inmunización del ganado vacuno frente a *Theileria parva* por el método de la infección y el tratamiento (vacuna viva)

1. Antecedentes

La vacunación contra *T. parva* se basa en un método de infección y tratamiento en el que se inyecta por vía subcutánea una alícuota de esporozoítos viables, y los animales se tratan simultáneamente con una formulación de una tetraciclina de acción prolongada; es el denominado método de la infección y el tratamiento (ITM) (Radley, 1981). Las tetraciclinas disminuyen la gravedad de la infección, y la infección leve resultante se controla normalmente por medio de la respuesta inmunitaria del hospedador, de manera que se consigue un estado de portador. El empleo de parásitos vivos para la inmunización siempre comporta riesgos; sin embargo, con un control de calidad apropiado y la determinación cuidadosa de la dosis para una inmunización segura y efectiva, el método puede utilizarse y se está utilizando con éxito en el campo. Se ha observado que algunas cepas de *T. parva* son capaces de infectar ganado vacuno de forma fiable sin inducir la enfermedad, y pueden utilizarse sin tratamiento con tetraciclina. Uno de estos estabilizados se está aplicando en el campo y ofrece unas ventajas considerables respecto a las infecciones por estabilizados potencialmente letales, y un ahorro en el coste de la vacunación. Sin embargo, distintos estabilizados obtenidos a partir de estas cepas pueden provocar una enfermedad grave en el ganado vacuno, acentuando la importancia de controlar cuidadosamente la dosis inmunizante.

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

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

Pueden producirse garrapatas infectadas por *Theileria parva* permitiendo que garrapatas de la especie *Rhipicephalus appendiculatus* se alimenten en las orejas de un animal que presente una infección activa por la FCE. Tras la muda, estas garrapatas, cuando previamente se han alimentado durante 4 días en conejos, tendrán esporozoítos infectivos en sus glándulas salivares. Triturando en un medio específico estas garrapatas previamente alimentadas, se liberarán los esporozoítos en el sobrenadante y podrá producirse un estabilizado (FAO, 1984) que se podrá crioproteger, y cuando haya la suficiente cantidad, se destinará a constituir un inóculo primario.

En caso necesario, se preparan estabilizados de inóculo de trabajo inyectando esporozoítos crioprotegidos, procedentes de un inóculo primario, en ganado vacuno experimental y produciendo un estabilizado de inóculo de trabajo como se describe abajo. Las vacunas deben producirse a partir de un inóculo (inóculo de trabajo) que no tenga ningún pase por garrapata tras la caracterización inmunológica, porque esta podría cambiar tras dicho pase.

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

i) Recogida de garrapatas de campo

Es importante que durante la preparación de los estabilizados inmunizantes se utilicen cepas de laboratorio bien caracterizadas de *R. appendiculatus*.

Si se recogen garrapatas de campo con fines experimentales, es importante tener en cuenta el posible peligro que suponen para la salud humana debido a los agentes patógenos que pueden albergar. El agente patógeno reconocido más importante es el virus de la fiebre hemorrágica de Guinea-Congo, que suele asociarse a garrapatas del género *Hyalomma* y que tiene una prevalencia alta en la distribución geográfica de *R. appendiculatus*. Por lo tanto, el personal que manipule garrapatas de campo deberá conocer los posibles peligros. Las garrapatas de la especie *Hyalomma* en general no deben extraerse de los hospedadores; las garrapatas total o parcialmente ingurgitadas no deben aplastarse entre los dedos. Si se extraen, deben manipularse con pinzas.

ii) Instalaciones para la manipulación de garrapatas

La manipulación en el laboratorio de garrapatas recogidas en el campo debe estar controlada, con el fin de evitar que se fijen a las personas. Las garrapatas recogidas en el campo deben aplicarse a conejos y a ganado vacuno para que se alimenten en estos animales, en todo caso en instalaciones de aislamiento. Los animales en los cuales se hayan alimentado garrapatas infectadas en el laboratorio o bien recogidas en el campo deberán sacrificarse. Tras la ingurgitación de garrapatas recogidas en el campo y alimentadas en animales de laboratorio, deben homogeneizarse alícuotas y analizarse para comprobar si contienen agentes patógenos para el ser humano, mediante inoculación en células de riñón de hámster neonato (BHK) y Vero. Los efectos de estas inoculaciones deben estudiarse a lo largo de tres pases. Las garrapatas que no se hayan utilizado deberán ser destruidas por medios químicos o mediante incineración.

Las pruebas de esterilidad y de ausencia de contaminación de los materiales biológicos destinados a uso veterinario se hallan en el capítulo 1.1.9. Dado que el material estabilizado deriva de conejos y otros animales de campo, sus cepas podrían ser causa de contaminación de la vacuna por agentes patógenos extraños. Los posibles agentes contaminantes son los causantes de la leucosis bovina, la micoplasmosis, la diarrea viral bovina y la EEB u otras especies de *Theileria* transmitidas por *R. appendiculatus*, entre otras bacterias y virus.

En caso de que se utilicen distintas cepas en las mismas instalaciones, los problemas de etiquetado pueden minimizarse empleando los lápices adecuados y códigos claros. La preparación de distintos estabilizados debe realizarse secuencialmente para evitar la contaminación cruzada y los errores de etiquetado. Para garantizar que se está/n utilizando la/s cepa/s adecuadas, debe introducirse un control regular de la calidad.

2.1.3. Validación como cepa vacunal

La cepa vacunal debe identificarse en ensayos de inmunidad cruzada. Se llevan a cabo con una cepa vacunal y con estabilizados derivados de cepas naturales de *T. parva* de la zona donde se requiere la protección con la cepa vacunal. Teóricamente, deben utilizarse cinco animales y dos controles en cada prueba, teniendo en cuenta que se procederá de dos formas distintas. En primer lugar, utilizando la vacuna como desafío en animales inmunizados con las cepas locales y confirmados mediante un desafío posterior con una cepa homóloga. Por otra parte, utilizando la/s cepa/s local/es como desafío en animales inmunizados con la vacuna y confirmados mediante un desafío posterior con una cepa homóloga. Ello proporcionará información sobre hasta qué punto una cepa vacunal conferirá protección. Por otra parte, los resultados indicarán si podría producirse un descubrimiento en la población local de *T. parva*, presente en animales portadores de la región donde va a utilizarse la vacuna. Una segunda prueba consiste en comprobar si la cepa vacunal puede controlarse mediante el tratamiento previsto durante el proceso de vacunación.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

Se producen lotes de vacuna en varios institutos de África oriental, empleando distintas cepas y posiblemente con parámetros distintos a los que aquí se describen. Para lograr constancia en la inmunización de campo, es fundamental que se preparen estabilizados de esporozoíto derivados de garrapata de una cepa inmunizante a partir de un “estabilizado de inóculo de trabajo” totalmente caracterizado. El “estabilizado de inóculo de trabajo” debe derivar directamente del “estabilizado del inóculo primario” de referencia, que esté disponible en cantidad suficiente para la futura preparación de estabilizados inmunizantes. Los estabilizados inmunizantes pueden prepararse según un conjunto de normas propuesto (Morzaria et al., 1999b).

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

Antes de empezar a producir vacuna, es necesario disponer de material de inóculo cuyas características se conozcan. Se distinguen tres tipos de material de inóculo:

i) Inóculo primario

El inóculo primario es un estabilizado de esporozoíto crioprotegido procedente de una cepa específica que se ha escogido y almacenado permanentemente y a partir de la cual derivan todos los demás inóculos. El inóculo primario debe consistir en un único lote uniforme de inóculo que ha sido mezclado e introducido en recipientes, como un solo lote. Dado que para el proceso de fabricación se utilizan esporozoítos infectivos de *T. parva*, el inóculo primario también representa la cepa primaria (véase el Capítulo 1.1.8). Para preparar un inóculo primario, se utilizan garrapatas adultas de la especie *R. appendiculatus* infectadas por *T. parva* que se hayan alimentado desde el estadio de ninfas en las orejas de un animal que presente una infección activa por la FCE. Tras la muda, estas garrapatas, cuando se hayan alimentado previamente durante 4 días en conejos, tendrán esporozoítos infectivos en sus glándulas salivares. Estos se pueden cuantificar diseccionando garrapatas previamente alimentadas y determinando los niveles de infección en las glándulas salivares en función de la coloración (Walker *et al.*, 1981). Triturando estas garrapatas previamente alimentadas en un medio específico, los esporozoítos se liberarán en el sobrenadante y podrá producirse un estabilizado (FAO, 1984) que podrá crioprotgerse en 100 tubos de crioprotección, cada uno de los cuales preferiblemente deberá contener un conjunto de acinos infectados equivalente por vial o, en el caso de una cepa nueva, un equivalente a 10 garrapatas infectadas por vial. Debe llevarse a cabo una prueba de viabilidad del inóculo primario una vez se haya crioprotegido durante al menos 24 horas, reviviendo uno de los criotubos.

ii) Inóculo de trabajo

El inóculo de trabajo deriva de esporozoítos infectivos a un nivel de pases entre el del inóculo primario y el del inóculo de producción. Para preparar un inóculo de trabajo, se inyecta el contenido de un único criotubo de inóculo primario en un animal de experimentación nunca antes expuesto, para producir una infección aguda por FCE.

iii) Inóculo de producción

Para preparar un lote de vacuna, se mezclan los contenidos de una cantidad suficiente de criotubos de inóculo de trabajo y la dosis adecuada se inyecta en el número requerido de reses de experimentación nunca antes expuestas, para producir una infección aguda por FCE.

La infección se establece con el estabilizado del inóculo de trabajo de *T. parva* mediante la inoculación del ganado vacuno sano serológicamente (e idealmente) negativo según la PCR frente a las enfermedades transmitidas por garrapatas. Durante la fase de parasitemia de la enfermedad resultante, ninfas limpias de *Rhipicephalus appendiculatus* cultivadas en el laboratorio se alimentan en los animales, y se recogen las garrapatas ingurgitadas e infectadas. Las garrapatas adultas resultantes se aplican entre 3 semanas y 4 meses después de la muda a las orejas de conejos sanos. Se aplican unas 600 garrapatas a cada oreja, y pasadas 24 horas se eliminan las garrapatas no adheridas. Después de cuatro días, se recogen las garrapatas y se toman muestras (normalmente 60 garrapatas) para determinar la proporción de infección en las glándulas salivares diseccionadas. Las garrapatas restantes se cuentan en lotes de 1.000 aproximadamente. Se puede obtener una estimación del número total de garrapatas contando y pesando un número determinado y pesando entonces el número total de garrapatas. Las garrapatas se lavan en un tamiz bajo un chorro rápido de agua del grifo y su superficie puede desinfectarse en con clorhidrato de benzalconio al 1%, o en alcohol al 70%, y ser lavan de nuevo en agua destilada.

Las garrapatas se depositan (~ 1.000) en tarros de cristal grueso o en vasos de precipitados de plástico, y se añaden 50 ml de MEM con sales de Hank o Earle y albúmina de plasma bovino (BPA) al 3,5%. Los tarros se mantienen en hielo, y las garrapatas se trituran utilizando un homogeneizador de tejidos (por ejemplo, Silverson LR2) durante 2 minutos empleando un cabezal de desintegración de apertura grande, y durante 3 minutos utilizando un cabezal de apertura pequeña (filtro emulsionante). En el caso de lotes más pequeños, un método alternativo puede consistir en triturar las garrapatas, en lotes de 1.000, en un mortero. Grupos de dos operarios de laboratorio aplastan las garrapatas en un mortero sin cesar, durante 15–30 minutos; inicialmente se utilizan 30–35 ml de MEM/medio de BSA al 3,5% frío, sin glicerina y con

50–100 g de perlas de vidrio. El resto (hasta 50 ml) de MEM/BSA sin glicerina se utiliza para enjuagar el mortero, la mano de mortero y el material de vidrio utilizado al aplastar las garrapatas. Obsérvese que la mayor parte del aplastamiento se realiza en las paredes laterales del mortero. Debe comprobarse que el aplastado sea correcto en un microscopio estereoscópico; si no es así, deben añadirse perlas de vidrio. LOS MEDIOS DEBEN MANTENERSE EN TODO MOMENTO A 4°C.

El material obtenido de la trituración de las garrapatas se lleva hasta 50 ml por cada 100 garrapatas, se centrifuga a 50 *g* durante 5 minutos, y se concentra el sobrenadante. Se añade un volumen igual de glicerol frío al 15% en MEM/BSA gota a gota mientras que el tejido de las garrapatas se mantiene frío en hielo y se remueve mediante un agitador magnético. El volumen final contendrá esporozoítos de un equivalente a diez garrapatas/ml. El número de equivalentes de garrapatas/ml puede ajustarse si la proporción de infección por parásito en un lote concreto de garrapatas fuese muy alta o muy baja. La concentración final de glicerol en el estabilizado de esporozoítos es del 7,5%.

Se acopla un dispensador al recipiente que contiene el triturado de garrapatas (intestino). Se llenan criotubos de 1 ml con el estabilizado (1 ml por vial), sin dejar de remover constantemente sobre un baño de hielo. Las alícuotas se guardan a 4°C. Como alternativa, se ha utilizado un equipo de inseminación artificial con tubos de plástico previamente identificados, como el que se emplea para dispensar el semen. Este sistema es el ideal para grandes volúmenes de estabilizados, y el código de color y el marcaje proporcionan una mayor seguridad respecto a la identidad del estabilizado inmunizante. Se debe permitir un tiempo de equilibrio de 30–45 minutos.

A continuación, las alícuotas se guardan en bandejas de aislamiento y se pasan a un ultracongelador a –80°C cuanto antes. Se mantienen ahí durante 24 horas, para que el estabilizado se enfríe progresivamente (congelación por pasos). En un segundo día, las alícuotas se transfieren a nitrógeno líquido, donde permanecerán hasta que se utilicen. Como alternativa, los viales pueden introducirse en gases de nitrógeno líquido durante 3 horas y a continuación sumergirse en el nitrógeno líquido como lugar definitivo de almacenamiento (Pipano, 1989b). La vacuna se transporta al campo en nitrógeno líquido. Los viales son extraídos en el lugar donde vaya a realizarse la vacunación, sumergiéndolos en agua tibia (38°C) durante 30 minutos para que se regeneren bien. La vacuna debe administrarse como máximo 60 minutos después de que se haya extraído del contenedor de nitrógeno líquido. Una vez descongelada, puede mantenerse viva sobre hielo (+4°C) otras 6 horas (Marcotty *et al.*, 2001; Mbao *et al.*, 2007). El método de la infección y el tratamiento suele aplicarse empleando tetraciclina de acción prolongada por vía intramuscular, y se recomienda que la tetraciclina se administre primero, por si un animal se escapa habiéndole administrado solo el estabilizado. A continuación, se inocular el estabilizado por vía subcutánea a la altura del ganglio linfático pre-parotídeo, en la base de la oreja.

Se ha descrito en detalle procedimiento para la preparación y prueba de una vacuna ITM multivalente (el cóctel Muguga) (Patel *et al.*, 2016). Es importante señalar que cada uno de los componentes estabilizados se produce antes de combinar las garrapatas infectadas y alimentadas inmediatamente antes de la homogeneización. Se calcula el número de garrapatas de cada componente para producir un estabilizado de vacuna final que contenga el mismo número de acinos infectados de cada componente.

2.2.3. Controles durante el proceso

Deben mantenerse registros de la procedencia y los pases del inóculo de trabajo. Los inóculos deben estar libres de agentes infecciosos como el de la leucosis bovina enzoótica, el virus de la inmunodeficiencia bovina, el pestivirus bovino, el virus sincitial bovino, la fiebre del Valle del Rift, etc. Los procedimientos analíticos dependerán de la disponibilidad, pero preferiblemente se emplearán pruebas de ADN.

2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad

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

ii) Seguridad

Tanto las garrapatas como los mamíferos de experimentación son posibles fuentes de contaminación por agentes patógenos extraños en los estabilizados. En ambos casos, los posibles contaminantes son *Ehrlichia bovis*, especies bovinas de *Borrelia*, orbivirus y bunyavirus, entre otros. Por lo tanto, no deben utilizarse garrapatas recogidas en el campo para preparar estabilizados que se vayan a utilizar para la vacunación. Para este fin, deben utilizarse colonias de garrapatas de laboratorio libres de patógenos y bien caracterizadas. Asimismo, las garrapatas solo podrán alimentarse en reses y conejos sanos, libres de parásitos transmitidos por garrapatas. Los estabilizados deben prepararse en condiciones asépticas. En algunas circunstancias, puede estar indicado utilizar antibióticos a las concentraciones adecuadas para cultivo tisular. Los estabilizados preparados deben someterse a pruebas de rutina de detección de posibles infecciones víricas en células BHK o Vero (como arriba). También deben someterse a una caracterización rutinaria *in vivo*, que debe incluir pruebas de infectividad en reses susceptibles intactas y de sensibilidad a las tetraciclinas y a otros fármacos anti-*Theileria*, y pruebas de inmunidad cruzada. Debe prepararse un “estabilizado de inóculo de trabajo” para asegurar la pureza de las cepas de *T. parva* en el estabilizado inmunizante subsiguiente.

Durante la preparación del estabilizado, es importante evitar que la cepa que se esté utilizando resulte contaminada por otras cepas de *T. parva*. Deben aplicarse procedimientos de garantía de calidad, por ejemplo para la manipulación de garrapatas infectadas, y las normas deben cumplirse al pie de la letra. La unidad de garrapatas debe garantizar una separación estricta entre garrapatas infectadas y no infectadas. El personal de dicha unidad debe emplear monos de uso exclusivo para cada lote de garrapatas que se emplee en la preparación del estabilizado, y dichos monos deben esterilizarse a diario. Debe evitarse el trabajar simultáneamente con varias cepas distintas. Los sistemas de almacenamiento del estabilizado deben incluir un etiquetado claro de cada tubo o pajilla de estabilizado, que también mencione el número preferible de dosis por vial o pajilla, el cual variará en función de si se utiliza en rebaños lecheros pequeños o pastorales, etc.

Las pruebas de control de calidad que se realicen en el estabilizado deben determinar la similitud con la cepa del inóculo primario, y también detectar las posibles contaminaciones por cepas indeseadas de *T. parva*.

iii) Potencia del lote

La evaluación del número de acinos infectados por *T. parva* en las glándulas salivares de la garrapata diseccionadas, antes de triturarla, es un indicador muy útil del grado de infección, pero no se tiene en cuenta la variable pérdida de viabilidad durante la preparación del estabilizado debida a la intensidad del triturado y al proceso de congelación y descongelación. Además, el estado de maduración de los esporozoítos es difícil de estimar mediante el examen histológico de las glándulas salivares de las garrapatas. Por consiguiente, la infectividad del estabilizado se determina mediante la inoculación de una dosis estándar de 1,0 ml en ganado vacuno susceptible. Se mezclan los contenidos de 2–4 tubos escogidos al azar y luego se titula en el ganado vacuno, y se establecen su infectividad y letalidad a distintas diluciones para su empleo en la inmunización. Como la respuesta del ganado al método de la infección y el tratamiento depende de su susceptibilidad a la infección es importante titular los estabilizados en ganado del mismo tipo que el que se va a inmunizar. La titulación de estabilizados de vacuna sigue siendo un tema discutible. Teóricamente, deben determinarse la dosis infectiva mediana (ID₅₀) y la dosis letal mediana (LD₅₀) mediante titulación del estabilizado empleando un intervalo de diluciones decimales (Duchateau *et al.*, 1998; 1999). A continuación, debe cuantificarse la ID₉₉₊ (que corresponde a cerca de un 100% de infectividad y tiene una letalidad muy baja) mediante una titulación más afinada,

empleando diluciones situadas alrededor de la LD₅₀. Respecto a las vacunas compuestas, la cuantificación de la dosis vacunal es compleja porque deben juntarse varias cepas, lo cual cambia la letalidad total de la vacuna (Speybroeck *et al.*, 2008). También se determina la sensibilidad frente a tetraciclinas, básicamente para proporcionar una dosis controlada de estabilizado, preferiblemente mediante una dosis única de una tetraciclina de acción prolongada administrada al mismo tiempo que la inoculación. La dosis inmunizante debe inducir una infección muy leve o subclínica, y el animal debe desarrollar un título serológico y ser inmune frente a una sensibilización homóloga letal. Si un tratamiento único con tetraciclina no suprime la infección en todo el ganado vacuno, entonces puede utilizarse una dosis más baja de estabilizado inmunizante o dos tratamientos con tetraciclina (en los días 0 y 4). Más recientemente, cuando se ha utilizado con una dilución apropiada de estabilizado, una dosis única de 30 mg/Kg de oxitetraciclina de acción prolongada ha mostrado ser efectiva en inmunizaciones de campo. Un método alternativo que se ha utilizado implica la infección con el estabilizado y el tratamiento con buparvacuona a 20 mg/Kg el octavo día (dependiendo del estabilizado). Este método puede aplicarse cuando las tetraciclinas no son fiables, pero requiere que el animal sea manipulado más de una vez. Un tratamiento único con buparvacuona a 2,5 mg/Kg en el momento de la infección también ha mostrado ser efectivo en infecciones con estabilizado que no se han controlado con un tratamiento único de 20 mg/Kg de una formulación de tetraciclina de acción prolongada.

Una vez que se establece el procedimiento que da por resultado una dosis inmunizante segura y efectiva, debe cumplirse estrictamente en el campo, de lo contrario puede tener lugar un fallo en la inmunización. También es importante que se determinen la dilución del estabilizado y la proporción droga/dosis en el ganado vacuno más susceptible en el que pueda ser utilizado.

2.3. Requisitos de autorización/registro/licencia

2.3.1. Proceso de fabricación

Para el registro de una vacuna, deben presentarse a las autoridades todos los datos pertinentes relativos a la fabricación y a las pruebas de control de calidad de la misma (véanse los apartados C2.2.2.1 and C2.2.2.2). Esta información debe corresponder a tres lotes de vacuna consecutivos de un volumen no inferior a 1/3 del volumen habitual de un lote industrial.

2.3.2. Requisitos de inocuidad

i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

Los esquizontes de *Theileria parva* no son peligrosos para el ser humano, pero sí infecciosos para el ganado vacuno, y la infección de animales nunca antes expuestos para producir lotes de vacuna, así como los estudios de titulación para cuantificar la dosis deben realizarse en instalaciones libres de garrapatas. Las pruebas de esterilidad y de ausencia de contaminación de los materiales biológicos destinados a uso veterinario se hallan en el capítulo 1.1.9. En una reunión celebrada en Malawi en 1988 se adoptaron las siguientes recomendaciones sobre la inocuidad durante la preparación, manipulación y entrega de las vacunas para el tratamiento de la infección por *T. parva* (Anon, 1989).

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

La introducción de una cepa inmunizante en una zona o país del que no es originaria puede dar como resultado que el parásito o uno o varios de los componentes de esta cepa se establezcan como portadores en el ganado vacuno y sean transmitidos por garrapatas. Debe considerarse el efecto a largo plazo sobre la epidemiología de la enfermedad de los parásitos nuevos (y potencialmente letales) antes de su introducción, y debe controlarse cuidadosamente después de la inmunización.

Antes de la inmunización, debe llevarse a cabo la caracterización de los parásitos en las poblaciones de destino, e intermitentemente después de la inmunización. Actualmente, la caracterización de las cepas de parásitos en relación con la vacunación se basa principalmente en la inmunización y en estudios de exposición cruzada en el ganado

vacuno. Sin embargo, en los laboratorios que poseen un alto grado de experiencia se han intentado aplicar varios métodos para caracterizar *in vitro* las cepas de parásitos. Varios estudios preliminares han mostrado que es posible que los concentrados de parásitos que difieren en su perfil de MAb no presenten una protección cruzada, mientras que las cepas que presentan perfiles similares ofrecen una protección cruzada (Irvin & Morrison, 1987). Sin embargo, en estudios más recientes en los que se han utilizado otras cepas de *T. parva* han demostrado que esa observación es errónea. Otro método ha utilizado clones de células T específicos frente a líneas celulares parasitadas para detectar diferencias antigénicas, ya que se cree que las respuestas de las células T son importantes como mediadoras de la inmunidad frente a *T. parva* y la especificidad de cepa observada en pruebas de matanza *in-vitro* refleja los resultados de las pruebas de desafío *in-vivo* (Irvin & Morrison, 1987; Taracha *et al.*, 1995). Actualmente no existen pruebas *in vitro* que se correlacionen con la protección *in vivo*. Recientemente se ha propuesto un índice de reacción frente a la enfermedad obtenido estadísticamente y basado en medidas parasitológicas, clínicas y hematológicas, para caracterizar los niveles de infectividad y virulencia de las distintas cepas del parásito y valorar la intervención del control frente a la teileriosis (Rowlands *et al.*, 2000; Schetters *et al.*, 2010). Asimismo, recientemente también se ha utilizado la tipificación del ADN para caracterizar estabilizados de vacuna y podría basarse en la genotipificación de múltiples loci empleando genes antigénicos polimórficos o marcadores satélite, o una combinación de ambos (Hemmink *et al.*, 2016; Patel *et al.*, 2011).

iii) Precauciones (peligros)

Durante la preparación de los estabilizados de esporozoito debe evitarse la infección del personal por aerosoles de agentes patógenos extraños cuando se trituran garrapatas. Las personas que trituren garrapatas deben recibir la formación correspondiente a los posibles peligros a los que se exponen; el acceso a las zonas donde se homogeneicen las garrapatas debe restringirse a personal especificado e informado; el personal debe llevar indumentaria protectora, incluidos guantes y mascarillas; y el triturado de garrapatas debe realizarse en una cabina de seguridad microbiológica (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*).

2.3.3. Requisitos de eficacia

i) Capacidad de proteger frente a la teileriosis transmitida de forma natural

Aunque un buen resultado en las pruebas por lotes realizadas en el producto final (véase la Sección C.2.2.4.iii) indican que un lote de vacuna es inmunogénico, es importante tener en cuenta que la protección contra cepas de desafío homólogas no necesariamente indica que la vacuna protegerá contra todas las cepas de *T. parva* naturales, y que el desafío de la 'aguja' utilizado en las pruebas por compartimentos no necesariamente refleja el desafío que supone la presencia de garrapatas. Esto solo se puede evaluar mediante pruebas de campo controladas, que son costosas, complicadas y largas. La necesidad o no de realizar pruebas de campo y hasta qué punto en cada lote de vacunas es el tema de debate y no existe un protocolo acordado. El enfoque menos intensivo, si las autoridades veterinarias lo permiten, es monitorear de cerca el 'despliegue' inicial de la vacuna después haber obtenido un buen resultado en las pruebas realizadas en el lote de producto final, tal como se han descrito anteriormente, prestando especial atención a la aparición de 'reactores' poco después de la vacunación y a la aparición de posibles casos de "iniciales" después de la exposición a la cepa natural.

ii) Uso en condiciones de campo

La vacuna congelada se mantiene viable en grandes repositorios de nitrógeno líquido en las instalaciones de producción y se transporta a las explotaciones en recipientes con nitrógeno líquido más pequeños. Se pueden establecer centros de campo para el almacenamiento y la distribución de la vacuna en áreas enzoóticas de teileriosis. El equipo básico necesario para la aplicación en el campo de la vacuna congelada incluye una jarra de boca ancha para preparar un baño de agua a 40°C, un termómetro para medir la temperatura del agua, pinzas largas, protección facial y guantes termorresistentes. La

aplicación de la vacuna congelada comienza con el uso de la protección facial y los referidos guantes. Con las pinzas se retira el número de viales requerido del recipiente de nitrógeno líquido. Al realizar esta operación, el bote debe exteriorizarse lo mínimo indispensable del refrigerador para evitar el rápido calentamiento del resto de los viales. Cada vial extraído debe examinarse para comprobar que no ha penetrado dentro el nitrógeno líquido que, aunque no altera la vacuna, puede causar la explosión del vial cuando se introduce en el baño de agua. Los viales deben mantenerse a temperatura ambiente 1-2 minutos para favorecer el escape del nitrógeno líquido, y luego se procesan del modo habitual. El pase de nitrógeno líquido al vial que contiene la vacuna ha planteado interrogantes sobre la esterilidad de la vacuna congelada. Sin embargo, el sistema se ha empleado durante décadas sin que se hayan observado problemas destacables.

2.3.4. Alcance de la inmunidad

A diferencia de *T. annulata*, donde se observa una protección cruzada considerable en diferentes cepas del campo, en *T. parva* se da una situación más compleja. Se utilizan dos estrategias para tratar de superar esta complejidad antigénica. En varios países se ha probado una combinación de tres cepas que proporcionan un amplio espectro de protección. El *International Livestock Research Institute* (ILRI, Nairobi) ha preparado dos grandes lotes de un estabilizado trivalente, el primero en 1996 para la FAO y otro en 2008. Estos estabilizados se han preparado según las últimas normas propuestas y se han utilizado de manera segura y efectiva en Tanzania. Se prepararán otros lotes en la Centro de la Unión Africana para las Garrapatas y las Enfermedades que Transmiten, Lilongwe, Malawi ante el aumento de la demanda del método de la infección y el tratamiento para la inmunización en las áreas endémicas de *T. parva* del África subsahariana. Si un estabilizado inmunizante no protege frente a una “cepa nueva”, esta nueva cepa debe aislarse, caracterizarse y analizarse, y debe plantearse su empleo, bien sola o junto con el estabilizado inmunizante actual. Otra estrategia consiste en preparar los estabilizados a partir de cepas nacionales o locales para su empleo en zonas definidas. Esta estrategia es más costosa en tiempo y recursos, pero evita, hasta cierto punto, la introducción de nuevas cepas en una zona. Con los desplazamientos de ganado existe un riesgo de introducción de diferentes cepas en una zona, lo que puede cortar la inmunidad proporcionada por la cepa local. Por lo tanto, es necesario evaluar cuidadosamente la utilización de cepas locales o de las introducidas para la inmunización (Geysen, 2008; McKeever, 2007).

El método de la infección y el tratamiento para la inmunización es efectivo siempre que se hagan cumplir las medidas adecuadas de garantía de calidad. A largo plazo, los problemas relacionados con la entrega y el riesgo de inducción de estados de portador y transmisión de la enfermedad ponen de manifiesto la necesidad de que se identifiquen antígenos protectores para poder desarrollar vacunas de subunidades.

2.3.5. Duración de la inmunidad

Ha habido pocos informes de estudios controlados destinados a determinar la duración de la inmunidad inducida por la infección y el tratamiento, ya sea en presencia o ausencia de cepas naturales. Sin embargo, Burridge *et al.* (1972) establecieron que el ganado bovino que había sobrevivido a una infección experimental (sin tratamiento) y que posteriormente se mantenía en un ambiente libre de ECF, sobrevivió a un desafío con cepa homóloga letal hasta 43 meses después.

2.3.6. Estabilidad

Mantenida en nitrógeno líquido, la vacuna congelada tiene un periodo de validez prácticamente ilimitado.

BIBLIOGRAFÍA

ALLSOPP B.A. & ALLSOPP M.T.E.P. (1988). *Theileria parva*: genomic DNA studies reveal non-specific diversity. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **28**, 77–84.

ALLSOPP B.A., BAYLIS H.A., ALLSOPP M.T.E.P., CAVALIER-SMITH T., BISHOP R.P., CARRINGTON D.M., SOHANPAL B. & SPOONER P. (1993). Discrimination between six species of *Theileria* using oligonucleotide probes which detect small subunit ribosomal RNA sequences. *Parasitology*, **107**, 157–165.

ANON (1989). Theileriasis in Eastern, Central and Southern Africa, Dolan T.T., ed. Proceedings of a meeting on East Coast fever immunization held in Malawi, 18–20 September 1988. International Laboratory for Research on Animal Diseases, Nairobi, Kenya, 174–176.

BILLIOUW M., BRANDT J., VERCRUYSE J., SPEYBROECK N., MARCOTTY T., MULUMBA M. & BERKVEN D. (2005). Evaluation of the indirect fluorescent antibody test as a diagnostic tool for East Coast fever in eastern Zambia. *Vet. Parasitol.*, **127**, 189–198.

BISHOP R., SOHANPAL B., KARIUKI D.P., YOUNG A.S., NENE V., BAYLIS H., ALLSOPP B.A., SPOONER P.R., DOLAN T.T. & MORZARIA S.P. (1992). Detection of a carrier state in *Theileria parva*-infected cattle by the polymerase chain reaction. *Parasitology*, **104**, 215–232.

BISHOP R.P., ALLSOPP B.A., SPOONER P.R., SOHANPAL B.K., MORZARIA S.P. & GOBRIGHT E.I. (1995). *Theileria*: improved species discrimination using oligonucleotides derived from large subunit ribosomal RNA sequences. *Exp. Parasitol.*, **80**, 107–115.

BISHOP R.P., SPOONER P.R., KANHAI G.K., KIARIE J., LATIF A.A., HOVE T., MASAKA S. & DOLAN T.T. (1994). Molecular characterization of *Theileria* parasites: application to the epidemiology of theileriosis in Zimbabwe. *Parasitology*, **109**, 573–581.

BROWN C.G.D. (1979). Propagation of *Theileria*. In: Practical Tissue Culture Application, Maramorosch K. & Hirumi H., eds. Academic Press, New York, USA, 223–254.

BURRIDGE M., MORZARIA S., CUNNINGHAM M. & BROWN C. (1972). Duration of immunity to East Coast fever (*Theileria parva* infection of cattle). *Parasitology*, **64**, 511–515.

CONRAD P.A., IAMS K., BROWN W.C., SOHANPAL B. & OLE-MOIYOI O.K. (1987). DNA probes detect genomic diversity in *Theileria parva* stocks. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **25**, 213–226.

DARGHOUGH M.E.A., BOUATTOUR A., BEN-MILED L. & SASSI L. (1996). Diagnosis of *Theileria annulata* – infection of cattle in Tunisia: comparison of serology and blood smears. *Vet. Res.*, **27**, 613–627.

DOLAN T.T. (1989). Theileriasis: A comprehensive review. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **8**, 11–36.

D'OLIVEIRA C., VANDERMERVE M., HABELA M., JACQUIET P. & JONGEJAN F. (1995). Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 2665–2669.

DUCHATEAU L., BERKVEN D.L. & ROWLANDS G.J. (1999). Decision rules for small vaccine experiments with binary outcomes based on conditional an expected power and size of the Fisher-exact test. *J. Appl. Statistics*, **26**, 689–700.

DUCHATEAU L., McDERMOTT B. & ROWLANDS G.J. (1998). Power evaluation of small drug and vaccine experiments with binary outcomes. *Stat. Med.*, **17**, 111–120.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (1984). Tick and Tick-borne Disease Control: A Practical Field Manual. FAO, Rome, Italy.

GEBREKIDAN H., GASSER R.B., PERERA P.K., McGRATH S., McGRATH S., STEVENSON M.A. & JABBAR A. (2015). Investigating the first outbreak of oriental theileriosis in cattle in South Australia using multiplexed tandem PCR (MT-PCR). *Ticks Tick Borne Dis.*, **6**, 574–578.

GEYSEN D. (2008). Live immunisation against *Theileria parva*: spreading the disease? *Trends Parasitol.*, **24**, 245–246.

- GEYSEN D., BISHOP R., SKILTON R., DOLAN T.T. & MORZARIA S. (1999). Molecular epidemiology of *Theileria parva* in the field. *Trop. Med. Int. Health*, **4**, A21–27.
- GODDEERIS B.M., KATENDE J.M., IRVIN A.D. & CHUMO R.S.C. (1982). Indirect fluorescent antibody test for experimental and epidemiological studies on East Coast fever (*Theileria parva* infection of cattle). Evaluation of a cell culture schizont antigen fixed and stored in suspension. *Res. Vet. Sci.*, **33**, 360–365.
- GRAY M.A., LUCKINS A.G., RAE P.F. & BROWN C.G.D. (1980). Evaluation of an enzyme immunoassay for serodiagnosis of infections with *Theileria parva* and *Theileria annulata*. *Res. Vet. Sci.*, **29**, 360–366.
- GUBBELS G., DE VOS A., VAN DER WEILDE M., VISERAS J., SCHOOLS L., DEVRIES E. & JONGEJAN F. (1999). Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridisation. *J. Clin. Microb.*, **37**, 1782–1789.
- GUBBELS M.J., HONG Y., VAN DER WEIDE M., QI B., NIJMAN I.J. & GUANGYUAN L. (2000). Molecular characterisation of the *Theileria buffeli/orientalis* group. *Int. J. Parasitol.*, **30**, 943–952.
- HASHEMI-FESHARKI R. (1988). Control of *Theileria annulata* in Iran. *Parasitol. Today*, **4**, 36–40.
- HASHEMI-FESHARKI R. (1998). Recent development in control of *Theileria annulata* in Iran. *Parasite*, **5**, 193–196.
- HEMMINK J.D., WEIR W., MACHUGH N.D., GRAHAM S.P., PATEL E., PAXTON E., SHIELS B., TOYE P.G., MORRISON W.I. & PELLE R. (2016). Limited genetic and antigenic diversity within parasite isolates used in a live vaccine against *Theileria parva*. *Int. J. Parasitol.*, **46**, 495–506.
- IRVIN A.D. & MORRISON W.I. (1987). Immunopathology, immunology and immunoprophylaxis of *Theileria* infections. In: Immune Response in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology, and Immunoprophylaxis, Soulsby E.J.L. ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 223–274.
- JEONG W., YOON S.H., AN D.J., CHO S.H., LEE K.K. & KIM J.Y. (2010) A molecular phylogeny of the benign *Theileria* parasites based on major piroplasm surface protein (MPSP) gene sequences. *Parasitology*, **137**, 241–249.
- KACHANI M., EL-HAJ N., KAHOUACHE & OUHELLI H. (2004a). Vaccin vivant contre la theileriose bovine constitué par des macroschizonte de *Theileria annulata*: innocuité, durée de l'immunité et absence de portage. *Revue Méd. Vet.*, **155**, 624–631.
- KACHANI M., EL-HAJ N. & OUHELLI H. (2004b). Condition de stockage d'un vaccin vivant contre *Theileria annulata*. *Revue Méd. Vet.*, **155**, 467–471.
- KARIUKI D.P., YOUNG A.S., MORZARIA S.P., LESAN A.C., MINING S.K., OMWOYO P., WAFULA J.L. & MOLYNEUX D.H. (1995). *Theileria parva* carrier state in naturally infected and artificially immunised cattle. *Trop. Anim. Health Prod.*, **27**, 15–25.
- KATENDE J., MORZARIA S., TOYE P., SKILTON R., NENE V., NKONGE C. & MUSOKE A. (1998). An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Theileria parva* antibodies in cattle using a recombinant polymorphic immunodominant molecule. *Parasitol. Res.*, **84**, 408–416.
- KAWAZU S., SUGIMOTO C., KAMIO T. & FUJISAKE K. (1992). Analysis of the genes encoding immunodominant piroplasm surface proteins of *Theileria sergenti* and *Theileria bufelli* by nucleotide sequencing and polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **56**, 169–176.
- KUBOTA S., SUGIMOTO C. & ONUMA M. (1995). A genetic analysis of mixed population in *Theileria sergenti* stocks and isolates using allele-specific polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.*, **57**, 279–282.
- MARCOTTY T., BILLIOUW M., CHAKA G., BERKVEN D., LOSSON B. & BRANDT J. (2001). Immunisation against East Coast fever by the infection and treatment method: evaluation of the use of ice baths for field delivery and appraisal of an acid formulation of long-acting tetracycline. *Vet. Parasitol.*, **99**, 175–187.

- MARCOTTY T.B.J., BILLIOUW M., CHAKA G., LOSSON B. & BERKVEN D. (2002). Immunisation against *Theileria parva* in eastern Zambia: influence of maternal antibodies and demonstration of the carrier status. *Vet. Parasitol.*, **110**, 45–56.
- MARITIM A.C., YOUNG A.S., LESAN A.C., NDUNGU S.G., MUTUGI J.J. & STAGG D.A. (1989). Theilerial parasites isolated from carrier cattle after immunization with *Theileria parva* by the infection and treatment method. *Parasitology*, **99**, 139–147.
- MBAO V., BERKVEN D., DORNY P., VAN DEN BOSSCHE P. & MARCOTTY T. (2007) Comparison of the survival on ice of thawed *Theileria parva* sporozoites of different stocks cryoprotected by glycerol or sucrose. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **74**, 9–15.
- McFADDEN A.M., RAWDON T.G., MEYER J., MAKIN J., CLOUGH R.R., THAM K., MULLNER P. & GEYSEN D. (2011). An outbreak of haemolytic anaemia associated with infection of *Theileria orientalis* in naive cattle. *N.Z. Vet. J.*, **59**, 79–85.
- McKEEVER D.J. (2007). Live immunisation against *Theileria parva*: containing or spreading the disease? *Trends Parasitol.*, **23**, 565–568.
- MORISSON W.I & Mc KEEVER D.J. (2006). Current status of vaccine development against *Theileria* parasites. *Parasitology*, **133**, S169–S187.
- MORZARIA S.P., KATENDE J., MUSOKE A., NENE V., SKILTON R. & BISHOP R. (1999a). Development of sero-diagnostic and molecular tools for the control of important tick-borne pathogens of cattle in Africa. *Parasitologia*, **41** (Suppl. 1), 73–80.
- MORZARIA S.P., MUSOKE A.J., DOLAN T.T., NENE V., NORVAL R.A.I. & BISHOP R. (1989). Studies on pathogenic *Theileria mutans*. Annual Scientific Report, International Laboratory for Research on Animal Diseases, Nairobi, Kenya, 7–8.
- MORZARIA S., SPOONER P., BISHOP R. & MWAURA S. (1999b). The preparation of a composite stabilate for immunisation against East Coast fever. In: Live Vaccines for *Theileria parva*: Deployment in Eastern, Central and Southern Africa. Proceedings of a Joint OAU, FAO and ILRI Workshop held at ILRI, Nairobi, Kenya 10–12 March 1997. ILRI, Kenya, 56–61.
- ODONGO D.O., SUNTER J.D., KIARA H.K., SKILTON R.A. & BISHOP R.P. (2010). A nested PCR assay exhibits enhanced sensitivity for detection of *Theileria parva* infections in bovine blood samples from carrier animals. *Parasitol. Res.*, **106**, 357–365.
- OUELLI H., KACHANI M., EL-HAJ N. & RAISS S. (2004). Vaccin vivant contre *Theileria annulata* et durée de l'immunité. *Revue Méd. Vet.* **155**, 472–475.
- OURA C.A., ODONGO D.O., LUBEGA G.W., SPOONER P.R., TAIT A. & BISHOP R.P. (2003). A panel of microsatellite and minisatellite markers for the characterisation of field isolates of *Theileria parva*. *Int. J. Parasitol.*, **33**, 1641–1653.
- PATEL E.H., LUBEMBE D.M., GACHANJA J., MWAURA S., SPOONER P. & TOYE P. (2011). Molecular characterization of live *Theileria parva* sporozoite vaccine stabilates reveals extensive genotypic diversity. *Vet. Parasitol.*, **179**, 62–68.
- PATEL E., MWAURA S., KIARA H., MORZARIA S., PETERS A. & TOYE P. (2016). Production and dose determination of Infection and Treatment Method Vaccine used to control East Coast fever in cattle. *Ticks Tick Borne Dis.*, **7**, 306–314.
- PHIPPS L.P., HERNÁNDEZ-TRIANA L.M., GOHARRIZ H., WELCHMAN D. & JOHNSON N. (2016). Detection of *Theileria luwenshuni* in sheep from Great Britain. *Parasites Vectors*, **9**, 203.
- PIPANO E. (1977). Basic principles of *Theileria annulata* control. In: Theileriosis, Henson J.B. & Campbell M., eds. International Development Research Centre, Ottawa, Canada, 55–65.
- PIPANO E. (1989a). Bovine theileriosis in Israel. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **8**, 79–87.

PIPANO E. (1989b). Vaccination against *Theileria annulata* theileriosis. In: Veterinary Protozoan and Hemoparasitic Vaccines, Wright I.G., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 203–234.

PIPANO E. (1997). Vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with special reference to quality assurance. *Trop. Anim. Health Prod.*, **29**, 86S–90S.

RADLEY D.E. (1981). Infection and treatment immunization against theileriosis. In: Advances in the Control of Theileriosis, Irvin A.D., Cunningham M.P. & Young A.S., eds. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, The Netherlands, 227–237.

ROWLANDS G.J., MUSOKE A.J., MORZARIA S.P., NAGDA S.M., BALLINGAL K.T. & MCKEEVER D.J. (2000). A statistically derived index for classifying East Coast fever reactions in cattle challenged with *Theileria parva* under experimental conditions. *Parasitology*, **120**, 371–381.

SCHETTERS T.P., ARTS G., NIESSEN R. & SCHAAP D. (2010). Development of a new score to estimate clinical East Coast fever in experimentally infected cattle. *Vet. Parasitol.*, **167**, 255–259.

SIBEKO K.P., OOSTHUIZEN M.C., COLLINS N.E., GEYSEN D., RAMBRITCH N.E., LATIF A.A., GROENEVELD H.T., POTGIETER F.T. & COETZER J.A. (2008). Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction test for the detection of *Theileria parva* infections in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) and cattle. *Vet. Parasitol.*, **155**, 37–48.

SKILTON R.A., BISHOP, R.P.; KATENDE, J.M.; MWAURA, S. & MORZARIA S.P. (2002). The persistence of *Theileria parva* infection in cattle immunized using two stocks which differ in their ability to induce a carrier state: analysis using a novel blood spot PCR assay. *Parasitology*, **124**, 265–276.

SPEYBROECK N., MARCOTTY T., AERTS M., DOLAN T., WILLIAMS B., LAUER J., MOLENBERGHS G., BURZYKOWSKI T., MULUMBA M. & BERKVEN D. (2008). Titrating *Theileria parva*: Single stocks against combination of stocks. *Exp. Parasitol.*, **118**, 522–530.

STEPANOVA N.I. & ZABLOTSKII V.T. (1989). Bovine theileriosis in the USSR. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **8**, 89–92.

TARACHA E.L.N., GODDEERIS B.M., MORZARIA S.P. & MORRISON W.I. (1995). Parasite strain specificity of precursor cytotoxic t cells in individual animals correlates with cross-protection in cattle challenged with *Theileria parva*. *Infect. Immun.*, **63**, 1258–1262.

WALKER A.R., YOUNG A.S. & LEITCH B.L. (1981) Assessment of *Theileria* infections in *Rhipicephalus appendiculatus* ticks collected from the field. *Z. Parasitenkd*, **65**, 63–69.

WATHANGA J.M., JONES T.W. & BROWN C.G.D. (1986). Cryopreservation of *Theileria* infected lymphoblastoid cells with functional assessment of viability. *Trop. Anim. Health Prod.*, **18**, 191–197.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Theileriosis
(puede consultarse la página web de la OIE:

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

Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para más información sobre pruebas de diagnóstico, reactivos y vacunas para la Theileriosis

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.