

## COWDRIOSIS

---

### RESUMEN

**Descripción e importancia de la enfermedad:** La cowdriosis (también conocida como hidrocarditis) es una enfermedad aguda, infecciosa, no contagiosa y fatal, producida por rickettsias en los rumiantes, causada por *Ehrlichia ruminantium* (anteriormente *Cowdria ruminantium*) y transmitida por garrapatas *Amblyomma*. Tiene lugar en casi todos los países de África e islas cercanas, y también en el Caribe. La enfermedad puede ocasionar una elevada mortalidad en los rumiantes domésticos susceptibles (hasta el 90%). Las cabras y las ovejas son más susceptibles que el ganado bovino y, en general, las razas europeas lo son más que las africanas.

Desde el punto de vista clínico, la enfermedad se presenta por lo general en forma aguda, caracterizada por fiebre alta repentina, postración, trastornos nerviosos y alta mortalidad. Entre las lesiones post mórtem asociadas a la enfermedad es común la presencia de hidropericardias, hidrotórax y edema pulmonar. Se presentan formas clínicas agudas y subagudas de la enfermedad. En las primeras se producen elevadas tasas de mortalidad sin muchas manifestaciones clínicas y en las segundas hay una mayor tasa de recuperaciones.

Los animales convalecientes se convierten en portadores de la infección. Algunos animales salvajes pueden jugar el papel de reservorios. El ciervo *Rusa*, el ciervo de cola blanca y la gacela saltarina son susceptibles a esta infección y pueden presentar una alta mortalidad

**Identificación del agente:** El diagnóstico específico de la cowdriosis se basa en la observación de colonias de *E. ruminantium* en las células endoteliales de los capilares del cerebro. En ausencia de las herramientas de diagnóstico molecular, se puede retirar un trozo del cerebelo con una cucharilla a través del foramen magnum después de cortar la cabeza. Se puede obtener una muestra de la corteza cerebral a través de un agujero hecho en el cráneo con un martillo y un clavo largo. Se preparan frotis del cerebro aplastando un trozo pequeño de la corteza del cerebro o del cerebelo entre dos portas de microscopio hasta formar una pasta y realizando una fina extensión. Los capilares se extienden en monocapa pasando un porta a lo largo del otro. Los frotis se secan al aire, se fijan con metanol y se tiñen con Giemsa. El color de las colonias (agrupaciones) de *E. ruminantium* varía de morado rojizo a azul, y a menudo están próximas al núcleo de las células endoteliales infectadas. Pueden ser escasas y difíciles de encontrar, especialmente en casos hiperagudos, pero están siempre presentes en el cerebro de los rumiantes que mueren de cowdriosis, si no se han tratado con fármacos. Es probable que no se detecten colonias en animales tratados con antibióticos. Las colonias pueden verse dos días después de la muerte en un cerebro mantenido a temperatura ambiente (20–25°C) y hasta 34 días después en un cerebro almacenado en un refrigerador a 4°C.

*Ehrlichia ruminantium* puede aislarse de la sangre de un hospedador infectado utilizando cultivos con células endoteliales de rumiantes. Cuando se produce un efecto citopático que consiste en la formación de placas de lisis celular, se confirma la presencia de mórulas características por tinción de la monocapa celular con Giemsa o RAL555 o mediante técnicas de inmunofluorescencia.

Actualmente se dispone de sistemas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada y la PCR en tiempo real dirigida a genes específicos de *E. ruminantium*, para la detección de la presencia de *E. ruminantium* en la sangre de los animales con síntomas clínicos, en órganos de animales muertos (lo cual confirma los casos clínicos de cowdriosis), y también en garrapatas vector. Sin embargo, es posible que estos sistemas no permitan detectar *E. ruminantium* en portadores asintomáticos. Se han desarrollado dos métodos multipatógeno, que incluyen la detección de *E. ruminantium*, que permiten el diagnóstico diferencial respecto a las

enfermedades transmitidas por garrapatas. Los métodos moleculares no solo se utilizan para el diagnóstico, sino que también se usan mucho para la investigación del genoma de *E. ruminantium* y para estudios epidemiológicos, como los de la prevalencia de la garrapata transmisora de *E. ruminantium*. Actualmente no se dispone de ningún kit comercial que permita la detección de *E. ruminantium*.

**Pruebas serológicas:** Se han evaluado dos enzimoimmunoanálisis (ELISA): un ELISA indirecto y un ELISA competitivo dirigido a anticuerpos anti proteína 1 antigénica mayor (MAP1).

as pruebas serológicas disponibles incluyen pruebas de inmunofluorescencia indirecta, enzimoimmunoensayos (ELISA) e inmunotransferencia (Western blot). Sin embargo, cuando se usan células completas de *E. ruminantium* como antígeno, se producen reacciones cruzadas con otras especies de *Ehrlichia* en todas las pruebas. La serología tiene aplicaciones diagnósticas limitadas.

El ELISA indirecto actual emplea un antígeno recombinante expresado como fragmento parcial de los antígenos MAP1 – el ELISA MAP1-B – que aporta una mejor especificidad que los métodos anteriores. No obstante, esta prueba todavía da positivo ante a la presencia de anticuerpos contra otros microorganismos del género *Ehrlichia* (reacciones cruzadas), como *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis* y especies del género *Ehrlichia* de la montaña Panola. Por tanto, el diagnóstico definitivo de la cowdriosis debe basarse en la evidencia epidemiológica y en pruebas moleculares adicionales que indiquen la presencia del microorganismo. Esta prueba ELISA puede ayudar a realizar un seguimiento de infecciones experimentales y a medir la respuesta inmunitaria de los animales vacunados cuyos antecedentes serológicos previos a la vacunación se conozcan. La serología tiene una utilidad diagnóstica muy escasa porque los animales clínicamente infectados permanecen seronegativos durante la reacción febril y solo sero-convierten tras la recuperación.

La serología tampoco es una prueba eficaz de importación. Antes de importar animales de una región donde la cowdriosis es endémica, es importante estudiar los datos epidemiológicos para intentar establecer que el ganado y las garrapatas de la zona no están infectadas. Se puede repetir la serología (a nivel de rebaño) y la PCR (en muestras de garrapata de rebaños vigilados) para comprobar que están libres de *E. ruminantium*.

**Requisitos para las vacunas:** En algunos países, aun se lleva a cabo la inmunización contra la cowdriosis por el método de ‘infección y tratamiento’ usando sangre infectada. Una vacuna de primera generación que consiste en cuerpos elementales de *E. ruminantium* purificados e inactivados, emulsionados en un adyuvante oleoso, ha dado resultados prometedores en condiciones experimentales controladas y ha demostrado una protección significativa en condiciones de campo. Al mejorar aun más el método de producción de vacuna inactivada, empleando biorreactivos, así como las condiciones de conservación del antígeno, además de cambiar el adyuvante, se ha observado una buena eficiencia en condiciones controladas. Se ha comprobado que un aislamiento adicional atenuado, Welgevonden, confiere una buena protección en condiciones controladas, y también se ha obtenido una protección significativa empleando una vacunación con ADN. Sin embargo, ninguna de estas nuevas vacunas experimentales se ha validado por completo en condiciones de campo. En ensayos de campo y estudios sobre la caracterización genética de las cepas se ha observado la presencia de un gran número de cepas de *E. ruminantium* en zonas restringidas. Así pues, la diversidad antigénica es importante para la formulación de vacunas eficaces y se requiere más investigación en el futuro para la aplicación de alguna vacuna en el campo.

## A. INTRODUCCIÓN

La cowdriosis (hidrocarditis) es una enfermedad de los rumiantes salvajes y domésticos producida por rickettsias, causada por *Ehrlichia ruminantium* (anteriormente *Cowdria ruminantium*) y transmitida por garrapatas *Amblyomma* (Marcelino *et al.*, 2016). *Ehrlichia ruminantium* se clasifica en el orden *Rickettsiales*, y en la familia *Anaplasmataceae*, junto con el género *Anaplasma*. Aunque los rumiantes son la diana principal del patógeno, se ha descrito en Sudáfrica una posible infección canina por *E. ruminantium*. Se han sospechado varios casos de encefalitis rápida y fatal en humanos por *E. ruminantium*. Sin embargo, en todos los casos, la evidencia de infección por *E. ruminantium* se basaba en pruebas moleculares. Resulta necesario el aislamiento y la caracterización del agente infeccioso antes de que pueda considerarse a *E. ruminantium* como un patógeno

emergente en especies distintas a los rumiantes, y especialmente en el hombre. Desde entonces, no se ha observado ningún otro caso clínico humano asociado a cowdriosis.

La cowdriosis es una enfermedad transmitida por garrapatas importante en el ganado de África y que tiene lugar en casi todos los países subsaharianos donde las garrapatas *Amblyomma* están presentes y en las islas circundantes: Madagascar, Reunión, Mauricio, Zanzíbar, las Islas Comoro y Santo Tomé. La enfermedad ha sido también descrita en tres isla del Caribe (Guadalupe, Maria Galante y Antigua) (Marcelino *et al.*, 2016). Todos los rumiantes domésticos y salvajes pueden resultar infectados, pero los primeros parecen ser más susceptibles. Los rumiantes domésticos indígenas son generalmente más resistentes a la enfermedad. Los animales salvajes podrían jugar un papel importante como reservorio, pero el ciervo Ruso, el de cola blanca, la gacela saltarina, el ciervo moteado o chital y el ciervo de Timor parecen ser las principales especies de rumiantes salvajes donde la cowdriosis puede tener un impacto económico importante.

El periodo de incubación natural medio es de 2–3 semanas, pero puede variar de 10 días a 1 mes. En la mayoría de los casos, la cowdriosis es una enfermedad febril aguda, con un rápido aumento en la temperatura corporal, que puede pasar de los 41°C entre 1 y 2 días después del comienzo de la fiebre. Se mantiene alta durante 4–5 semanas con pequeñas fluctuaciones y baja inmediatamente antes de la muerte.

La fiebre va seguida de inapetencia, algunas veces de postración, diarrea, particularmente en el ganado vacuno, y de disnea, indicativa de edema pulmonar. Los trastornos nerviosos se desarrollan gradualmente. El animal está inquieto, camina en círculos, hace movimientos de succión y está de pie muy rígido con temblores en los músculos superficiales. El ganado vacuno puede empujar su cabeza contra una pared o presentar un comportamiento agresivo o ansioso. Finalmente, el animal cae al suelo, mostrando movimientos de pedaleo y opistótonos, nistagmos y movimientos de masticación. El animal muere generalmente durante el ataque o inmediatamente después.

La manifestación subaguda de la cowdriosis con síntomas menos pronunciados y la hiperaguda con muerte repentina, se pueden dar también dependiendo de la raza del rumiante y de la cepa de *E. ruminantium* implicada.

Las lesiones macroscópicas más comunes son el hidropericardias, hidrotórax, edema pulmonar, congestión intestinal, edema de los nódulos linfáticos mediastínicos y bronquiales, petequias en el epicardio y endocardio, congestión del cerebro y esplenomegalia moderada (Marcelino *et al.*, 2016).

El diagnóstico provisional de la cowdriosis se basa en la presencia de vectores de *Amblyomma*, de trastornos nerviosos, y la presencia de transudados en el pericardio y en el tórax en el examen post mórtem. Cuando se realiza un diagnóstico basado en los síntomas clínicos se deben considerar también las siguientes enfermedades: la babesiosis cerebral bovina y la teileriosis, la anaplasmosis, el botulismo, la infección por nemátodos (hemancosis) de los pequeños rumiantes, la rabia y los envenenamientos.

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

**Tabla 1.** Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la cowdriosis y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
<b>Identificación del agente</b>						
Aislamiento de la bacteria <i>in-vitro</i>	–	–	–	+	–	–
PCR en tiempo real	+++	–	–	+++	–	–
PCR anidada	+++	–	–	+++	–	–

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
PCR en tiempo real multipatógeno	+++	–	–	+++	–	–
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
ELISA	++	+	–	–	+++	++

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito  
 \*Puede utilizarse para el cribado de poblaciones de garrapatas, paralelamente a las pruebas serológicas realizadas en los hospedadores.  
 PCR = reacción en cadena de la polimerasa; ELISA = enzimoanálisis.

### 1. Identificación del agente

Durante la fase febril se puede aislar fácilmente *E. ruminantium* en cultivos de sangre o plasma; sin embargo, es difícil detectar estos microorganismos en los frotis de sangre. Se pueden observar colonias típicas de *E. ruminantium* en frotis del cerebro después de la muerte y esto representa un diagnóstico definitivo de la cowdriosis.

No es necesario abrir el cráneo. Un método alternativo consiste en cortar la cabeza por la primera vértebra cervical. Después se introduce una cucharilla a través del foramen magnum, entre la médula y las meninges. Se vuelve la cucharilla hacia el cerebro y se retira con un trozo de cerebelo. Otro método consiste en hacer un agujero en el cráneo con un martillo y un clavo largo y aspirar una muestra de corteza cerebral con una aguja unida a una jeringa. Estos métodos también disminuyen el riesgo para el operador en los casos en los que los trastornos nerviosos han sido producidos por la rabia.

En los animales vivos, se puede obtener una biopsia del cerebro de forma aséptica después de la anestesia local, aunque con dificultad, y deben guardarse ciertas precauciones en los animales grandes y especialmente en los que tienen cuernos. Las colonias de *Ehrlichia* se observan durante el periodo febril. Este método es útil para los estudios experimentales, pero no es adecuado para los diagnósticos rutinarios.

Las colonias de *E. ruminantium* aún están presentes 48 horas después de la muerte en un cerebro mantenido a temperatura ambiente (20–25°C) y hasta 34 días en un cerebro almacenado en un refrigerador a 4°C.

Se coloca un fragmento pequeño de materia gris (de un tamaño similar al de una cabeza de cerilla) en un porta de microscopio, aplastado hasta conseguir una consistencia pastosa con otro porta y, mientras se mantiene la presión, los portas se deslizan uno sobre otro en sentido longitudinal para producir una monocapa celular. Los portas se secan al aire, se fijan en metanol, y se tiñen con eosina y azul de metileno o Giemsa.

A continuación, los portas se examinan al microscopio con un aumento bajo (objetivo x10) para localizar los capilares cerebrales y con un aumento de al menos x50 para identificar colonias de rickettsias. *Ehrlichia ruminantium* es un microorganismo cocoide que se tiñe de un color entre púrpura rojizo y azul en el citoplasma, cerca del núcleo de la célula, el cual se tiñe de rosa (Marcelino *et al.*, 2016). Se requiere experiencia, puesto que las colonias de *E. ruminantium* deben diferenciarse de otros hemoparásitos (como *Babesia bovis*), de ciertas células sanguíneas (trombocitos, granulocitos), de estructuras subcelulares normales (mitocondrias, gránulos de mastocitos) y de artefactos de la tinción (precipitados del colorante).

Las colonias de *E. ruminantium* están formadas por agrupaciones de gránulos (0,2–0,5 µm), organizados a veces formando un anillo o una herradura (1–3 µm), situados cerca del núcleo dentro de la célula endotelial. Los gránulos pueden ser escasos, particularmente en casos hiperagudos, pero se encuentran siempre en el cerebro de los animales que han muerto de cowdriosis. Sin embargo, si el animal fue tratado con deoxiciclina o tetraciclina 24 horas antes, los gránulos de *Ehrlichia* tienden a fundirse, lo que hace que el diagnóstico sea muy difícil, y a veces imposible. Se ha empleado la microscopía electrónica de transmisión para poner de manifiesto que *E. ruminantium* se desarrolla dentro de una estructura de tipo vacuolar, que está envuelta por una membrana en el citoplasma de la célula endotelial. Cada microorganismo está envuelto por una doble membrana. Dentro de la estructura de tipo vacuolar, se pueden identificar formas electrodensas de *E. ruminantium* (cuerpos elementales), así como formas reticuladas intermedias.

### 1.1. Aislamiento de *Ehrlichia ruminantium* usando cultivos *in-vitro*

Aunque numerosas líneas celulares permiten el crecimiento de *E. ruminantium* el aislamiento no es la prueba elegida para el diagnóstico de cowdriosis, ya que es intenso y largo. Para un diagnóstico rápido, son preferibles los métodos moleculares. Sin embargo, debe recomendarse el aislamiento de *E. ruminantium* para tipificar las cepas presentes en una región a efectos de los programas de vacunación. Se puede aislar *Ehrlichia ruminantium* de la sangre de los animales infectados por cultivo sobre células endoteliales de rumiantes. Las células endoteliales del cordón umbilical, la aorta o la arteria pulmonar de diferentes especies de rumiantes (ganado vacuno, cabras y ovejas) se utilizan a menudo para el aislamiento, aunque se han descrito otros tipos de células endoteliales (capilares del cerebro, células endoteliales circulantes, etc.) para el cultivo rutinario de los microorganismos. Las líneas celulares endoteliales de marta, antilope orix, búfalo, kudo, y el cerdo salvaje se pueden utilizar también para cultivar *E. ruminantium*. No se ha designado aún ninguna línea celular estándar para el aislamiento.

#### 1.1.1. Procedimiento de aislamiento

- i) La sangre del animal afectado clínicamente (lo óptimo es extraerla el segundo o tercer día de la reacción febril) se recoge con un anticoagulante (heparina o citrato sódico, no EDTA) y se diluye a 1/2 en el medio de cultivo que consiste en el medio mínimo esencial de Glasgow (MEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado, 200 mM de L-glutamina, y antibióticos si es preciso (penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml).
- ii) El medio de cultivo se elimina de la monocapa celular endotelial y se añade sangre extraída (aproximadamente 2 ml para un frasco de 25 cm<sup>2</sup>). El frasco se incuba a 37°C (si es posible con un 5% de CO<sub>2</sub>) en un agitador rotatorio durante 2 horas.
- iii) Después de la incubación, se elimina la sangre y la monocapa se lava cuidadosamente tres veces con medio de cultivo precalentado a 37°C. Se añade medio de cultivo fresco (5 ml por frasco de 25 cm<sup>2</sup>) y el frasco se incuba a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>). El medio se cambia cada dos días.

(El uso de plasma en lugar de sangre es más eficiente cuando se toma de un animal con una reacción febril >41°C. En este caso, los pasos ii y iii mencionados anteriormente pueden reemplazarse por lo siguiente:

- a) Se siembran 4 ml de plasma (se puede usar un inóculo menor si se dispone de una cantidad de plasma limitada) sobre un cultivo celular endotelial susceptible y se incuban durante 1 hora a 37°C en un agitador rotatorio.
- b) Se lava el plasma tres veces con medio de cultivo precalentado a 37°C, y después se añaden 5 ml de medio de cultivo (por cada frasco de 25 cm<sup>2</sup>) y se observa el desarrollo del efecto citopático.
- iv) La monocapa se inspecciona regularmente para observar la aparición de pequeñas placas de lisis celular. Las primeras placas aparecen generalmente después de dos semanas. El pase a monocapas celulares sin infectar se lleva a cabo cuando la lisis alcanza el 80% de la capa celular. Las células restantes se tiñen con eosina y azul de metileno o Giemsa y se examinan al microscopio para detectar la presencia de mórulas de *E. ruminantium* (Marcelino *et al.*, 2016).

## 2. Métodos moleculares

### 2.1. Detección de *Ehrlichia ruminantium* utilizando la PCR y la PCR anidada

Se han desarrollado dos PCR anidadas para aumentar la detección de niveles bajos de rickettsias (Martinez *et al.*, 2004; Semu *et al.*, 2001). Ambos emplean la región pCS20 como la secuencia diana. El ensayo de Semu *et al.* usa dos cebadores externos U24 (5'-TTT-CCC-TAT-GAT-ACA-GAA-GGT-AAC-3') y L24 (5'-AAA-GCA-AGG-ATT-GTG-ATC-TGG-ACC-3') y después el AB 128 (5'-ACT-AGT-AGA-AAT-TGC-ACA-ATC-TAT-3') y el AB 129 (5'-TGA-TAA-CTT-GGT-GCG-GGA-AAT-CCT-T-3') para la reacción anidada. La sensibilidad analítica de detección de este ensayo es de 1 microorganismo por reacción. En el otro ensayo de PCR anidada (Martinez *et al.*, 2004) se usa un par de cebadores externos que incluye AB128/ AB130 (5'-ACT-AGC-AGC-TTT-CTG-TTC-AGC-TAG 3') seguido de una segunda amplificación basada en los cebadores AB128/AB129. El producto final de la PCR es de 278 pb. La PCR anidada muestra una mejora en sensibilidad de cien veces si se la compara con una PCR simple AB128/AB129, y un límite de detección promedio de 6 microorganismos por reacción.

Se observó una falta de amplificación con la PCR anidada *pCS20* convencional debido a polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en zonas de hibridación del cebador del ADN del fragmento *pCS20*. Así pues, los cebadores AB128/129 y 130 modificados mediante nucleótidos universales permitieron la detección de una amplia gama de cepas de *E. ruminantium*: AB128' (5'-ACT-AGT-AGA-AAT-TGC-ACA-ATC-YAT-3'), AB130' (5'-RCT-DGC-WGC-TTT-YTG-TTC-AGC-TAK-3') y AB129' (5'-TGA-TAA-CTT-GGW-GCR-RGD-ART-CCT-T-3'). Esta PCR anidada *pCS20* se utiliza de forma habitual en el Laboratorio de Referencia de la OIE para fines de diagnóstico con muestras de sangre de casos clínicos y para el cribado de garrapatas (Adakal *et al.*, 2009; 2010a; Cangi *et al.*, 2016). Las PCR anidadas *pCS20* permiten la detección en órganos (pulmón y encéfalo) de animales muertos infectados, en sangre de animales infectados extraída durante la hipertermia, y en garrapatas frescas, congeladas o conservadas en etanol al 70%. La detección de *E. ruminantium* mediante PCR anidada es posible en la sangre de animales 1 o 2 días antes de la hipertermia y durante la hipertermia, pero no en animales asintomáticos.

Se ha desarrollado una PCR anidada dirigida al gen polimórfico *map1* completo en paralelo para tipificar las cepas por el polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) o secuenciando el fragmento de amplificación directamente de las muestras patológicas que dan positivo en la PCR anidada con *pCS20* (Martinez *et al.*, 2004). La PCR anidada con *map1* funciona bien aunque con una sensibilidad ligeramente más baja que la PCR anidada con *pCS20*, con 60 copias por muestra. Este sistema es útil para la caracterización genética de *E. ruminantium* pero no para el diagnóstico, debido a la propiedad polimórfica de genes dirigidos a *map1*.

La caracterización y la estructura genéticas de la población de *E. ruminantium* a nivel regional es fundamental para la selección de posibles cepas vacunales. La tipificación genética de cepas se había realizado previamente con RFLP en el gen polimórfico *map1* tras la amplificación con PCR (Adakal *et al.*, 2010b; Faburay *et al.*, 2007). No obstante, se han validado métodos multi-locus adaptados a *E. ruminantium*, como la tipificación de la secuencia multi-locus (Adakal *et al.*, 2009) o análisis de secuencias multi-locus de número variable de repeticiones en tandem (Pilet *et al.*, 2012). Estos sistemas se están utilizando en muestras de garrapatas de campo para estudios de epidemiología molecular con el fin de caracterizar mejor la estructura genética de cepas de *E. ruminantium* (Adakal *et al.*, 2010a; Cangi *et al.*, 2016). No obstante, estas caracterizaciones genéticas no se asocian a clusters de protección.

## 2.2. Detección de *Ehrlichia ruminantium* utilizando la PCR en tiempo real

Se han desarrollado varias PCR en tiempo real dirigidas a los genes de las regiones *map1*, *map1-1* y *pCS20* para la detección de *E. ruminantium*. Se utilizaron PCR en tiempo real SYBR Green dirigidas a *map1* y *map1-1* para detectar y cuantificar *E. ruminantium* in vitro durante la producción masiva de antígeno en un biorreactor y en ovejas infectadas experimentalmente durante el periodo de hipertermia (Marcelino *et al.*, 2005; 2007; Peixoto *et al.*, 2005; Postigo *et al.*, 2002). Se probaron para un número bajo de cepas (un máximo de seis) y, por lo tanto, no se recomiendan para fines de diagnóstico debido a las características polimórficas de la familia multigénica *map1*.

Se ha desarrollado una PCR en tiempo real dirigida a la región *pCS20* empleando una sonda marcada con fluorescencia para detectar *E. ruminantium* en sangre de ganado y en garrapatas de campo, y tiene una sensibilidad similar a la PCR anidada, de siete copias por muestra. Las secuencias de cebadores y sonda son las siguientes: CowF (5'-CAA-AAC-TAG-TAG-AAA-TTG-CAC-A-3'), CowR (5'-TGC-ATC-TTG-TGG-TGG-TAC-3') y Cow (5'-FAM-TCC-TCC-ATC-AAG-ATA-TAT-AGC-ACC-TAT-TA-XT-PH-3'). Lamentablemente, este ensayo ha mostrado reacción cruzada con *E. canis* y *E. chaffeensis*. Sí ha permitido detectar correctamente 15 cepas distintas de *E. ruminantium* (Steyn *et al.*, 2008). Como se ha demostrado previamente respecto a la PCR anidada con *pCS20*, la presencia de SNP en regiones de hibridación podría inhibir la detección de las cepas. Para validar por completo este método, es necesario probarlo en más cepas.

Más recientemente, se ha desarrollado una nueva PCR en tiempo real dirigida a otra región de *pCS20* y ha mostrado buena reproducibilidad, sensibilidad y especificidad, con un límite de detección de 6 copias por muestra. Puede utilizarse con las sondas fluorescentes apropiadas. Los cebadores y las sondas son los siguientes: Sol1F (ACA-AAT-CTG-GYC-CAG-ATC-AC), Sol1R (CAG-CTT-TCT-GTT-CAG-CTA-GT) y Sol1<sup>TqM</sup> (6-FAM-ATC-AAT-TCA-CAT-GAA-ACA-TTA-CAT-GCA-ACT-GG-BHQ1). Detecta 16 cepas de *E. ruminantium* de distintas zonas geográficas y no hay protección cruzada con *Anaplasma marginale*, *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *E. canis*, *E. muris* and *Rickettsia felis* ni *parkeri* (Cangi *et al.*, 2017). Se ha probado con 700 muestras de campo de garrapatas de Mozambique y se utilizará de forma habitual en el Laboratorio de Referencia de la OIE para fines de diagnóstico y para el cribado de garrapatas.

Aunque la PCR anidada y la PCR en tiempo real han demostrado ser muy efectivas para la detección de infección en muestras de garrapatas o de animales durante la fase clínica de la enfermedad o tras la muerte, tal vez no permitan la detección de *E. ruminantium* en rumiantes portadores sanos. Una técnica útil para confirmar el estado de un animal portador sospechoso respecto a la cowdriosis, cuya sangre sea negativa según la PCR, consiste en poner lotes de garrapatas nunca antes expuestas a la enfermedad sobre el animal para que se alimenten de este, y a continuación analizar las garrapatas mediante una PCR anidada o en tiempo real para *pCS20*. No se sabe si las garrapatas actúan simplemente concentrando microorganismos circulantes o amplificando su número o incluso induciendo la liberación de microorganismos en la circulación mientras se alimentan.

### 2.3. Detección de *E. ruminantium* mediante PCR en tiempo real multipatógeno

Se ha desarrollado una PCR en tiempo real FRET para diferenciar entre ocho especies distintas de cuatro grupos en una sola reacción: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris*, *E. ovina*, *Ehrlichia* sp. BOV2010, especies de *Ehrlichia* de la montaña Panola y *E. ruminantium* (Zhang *et al.*, 2015). Se basa en la amplificación de ARN recombinante de la subunidad 16S y emplea dos sondas fluorescentes; se detectan distintas curvas de disociación en función de la especie. *Ehrlichia ruminantium* podría diferenciarse claramente de otras especies con la temperatura de fundición más baja. El límite de detección es de 5 copias por muestra, y la detección simultánea es posible con una mezcla de 300 copias de cada especie. No obstante, solo se ha probado con cuatro cepas de *E. ruminantium*. Aunque no se produzca mucha falta de amplificación debido a que la prueba va dirigida al gen conservado de ARN ribosomal recombinante de la subunidad 16S, es necesaria una validación con más cepas de *E. ruminantium*.

Por otra parte, Saylor *et al.* desarrollaron una PCR en tiempo real Taqman dual-plex dirigida al gen groEL de cepas de *Ehrlichia* de la montaña Panola y de *E. ruminantium* (Saylor *et al.*, 2016). Este ensayo permite diferenciar entre cepas de *Ehrlichia* de la montaña Panola, que son endémicas de EE.UU., y *E. ruminantium*, que actualmente no se encuentra presente. El límite de detección es de 10 copias por muestra, y ha permitido detectar 27 cepas de *E. ruminantium* de 11 países. Por lo tanto, parece que se trata de un método prometedor para el diagnóstico diferencial entre dos especies.

### 2.4. Detección de *Ehrlichia ruminantium* mediante la técnica de la hibridación inversa

La hibridación inversa (RLB – reverse line blot) se ha utilizado para la detección e identificación simultánea de especies de *Anaplasma* y *Ehrlichia* que se sabe que infectan a los rumiantes, en base a diferencias en un gen rARN de la subunidad pequeña (Bekker *et al.*, 2002). Se diseñaron los cebadores 16S8FE y B-GA1B-nuevo a partir de dominios conservados y se utilizaron para amplificar un fragmento de 492-498 pb del gen rARN de la subunidad 16S que abarcaba la región V1 variable. Asimismo, se diseñaron sondas oligonucleotídicas específicas de especie en este bucle V1 para lograr la detección específica de especie de *E. ruminantium*, *E. ovina*, *Ehrlichia* sp. cepa Omatjenne, *Anaplasma marginale*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. ovis* y *A. phagocytophilum*. También se diseñó una sonda oligonucleotídica que presentaba reacción cruzada con todas las especies (sonda universal) para utilizarla como control en el caso de que un producto de la PCR no se hibridara con ninguna de las sondas específicas de especie. En este método, las sondas específicas de especie se unen de forma covalente a la membrana de hibridación, que se hibrida con el producto de la PCR obtenido con los cebadores 16S8FE y B-GA1B-nuevo. Se comprobó que los productos de la PCR obtenidos a partir de todos los microorganismos mencionados arriba se unen solo a sondas oligonucleotídicas específicas. No se detectó ningún producto de la PCR y no se produjo ninguna hibridación al aplicar la PCR-RLB a ADN de *Theileria annulata*, de *Babesia bigemina* o de mamífero. De forma similar, las garrapatas que se utilizaron como controles negativos siempre dieron resultados negativos en la prueba RLB, mientras que se pudo detectar infección por *Ehrlichia ruminantium* en un 15–70% de las garrapatas que se habían alimentado en ovejas infectadas experimentalmente o que fueran portadoras de larga duración. En Mozambique, *E. ruminantium* también se pudo detectar en la sangre de 12 pequeños rumiantes centinela situados en el campo con los animales infectados; se detectó infección mixta en cinco de los animales centinela infectados, lo cual demostró la utilidad de este método para detectar infecciones múltiples. La RLB se ha utilizado recientemente en varios estudios del oeste de Kenia y de Nigeria destinados a evaluar la prevalencia de enfermedades del ganado transmitidas por garrapatas (Lorusso *et al.*, 2016; Njiiri *et al.*, 2015), pero se ha obtenido una prevalencia muy baja de *E. ruminantium*. Los autores sugirieron que las secuencias de los cebadores y de las sondas utilizadas en la RLB no se habían adaptado a las cepas de *E. ruminantium* de Kenia.

### 2.5. Lectura de los resultados

Teniendo en cuenta que *E. ruminantium* es una bacteria intracelular obligada que no puede cultivarse en medios acelulares y que su aislamiento es complejo y dura varias semanas, las técnicas de

detección molecular son los mejores métodos para el diagnóstico de la cowdriosis. Se ha comprobado que la PCR en tiempo real anidada es más fácil de llevar a cabo y más sensible que la RLB. Sin embargo, en las pruebas de PCR hay que tener cuidado y asegurarse de que no se produzca una contaminación cruzada entre las muestras. Se deben incluir controles positivos y negativos en cada prueba. En cada ejecución de la PCR, ya sea anidada o en tiempo real, deben incluirse controles de extracción positivo y negativo (de sangre u órganos infectados experimentalmente y no infectados, y de garrapatas infectadas o no infectadas), lo cual permitirá la detección de errores en los procedimientos de extracción. En cada muestra deberá comprobarse la ausencia de productos que puedan causar inhibición, buscando un gen de mantenimiento del vector o del hospedador, como ADN ribosomal 16S o 18S (para el cribado de las garrapatas, Cangí *et al.*, 2017). Considerando que la serología de la cowdriosis tiene muchas limitaciones (véase la sección B.3.), la PCR podría utilizarse para ayudar a confirmar si los animales seronegativos de un área endémica no están infectados antes de su transporte a un área libre de cowdriosis que presente el riesgo de infectarse por la presencia de vectores potenciales. El cribado de garrapatas mediante PCR, junto con pruebas serológicas en los rebaños vigilados a lo largo del tiempo, podrían resultar útiles para establecer el estado del rebaño respecto a la enfermedad ante posibles desplazamientos de los animales desde una zona endémica a una zona libre. Sin embargo, *E. ruminantium* no puede detectarse en portadores asintomáticos mediante métodos moleculares. Los resultados obtenidos mediante PCR anidada, RLB y PCR en tiempo real muestran que la detección directa de *E. ruminantium* en la sangre solo es fiable durante y en torno a la fase febril de la enfermedad. Los métodos basados en la PCR parecen ser más fiables para detectar la infección en las garrapatas, y esto podría tener cierto valor epidemiológico para determinar la distribución geográfica de *E. ruminantium*. Además, cuando es necesario en áreas endémicas, la inclusión de garrapatas de prueba (originalmente sin infectar) alimentadas sobre un animal sospechoso mejoraría la sensibilidad de la detección de portadores cuando han fallado la serología y la PCR con la sangre. Sin embargo, este procedimiento no es conveniente para los laboratorios de diagnóstico rutinario, ya que requiere el mantenimiento de colonias de garrapatas y la capacidad para infectar animales experimentalmente.

### 3. Pruebas serológicas

Para minimizar el problema de las reacciones cruzadas con *Ehrlichia* spp., se han desarrollado dos ELISA sobre un antígeno MAP1 recombinante. El primero es un ELISA indirecto que utiliza una región inmunogénica de la proteína MAP1 (llamada MAP1-B) y produce muchas menos reacciones cruzadas con *Ehrlichia* spp (ELISA con MAP1-B) (Semu *et al.*, 2001). El segundo es un ELISA competitivo que utiliza el gen *map1* clonado en un baculovirus y anticuerpos monoclonales (MAbs) producidos contra la proteína MAP1 (C-ELISA con MAP1) (Mondry *et al.*, 1998). Ambas pruebas han mejorado la especificidad notablemente, pero aún muestran alguna reactividad con sueros de título alto contra *E. canis*, *E. chaffeensis* y especies de *Ehrlichia* de la montaña Panola. Se ha observado reacción cruzada de suero de cabras infectadas por especies de *Ehrlichia* de la montaña Panola con el antígeno MAP1-B de *E. ruminantium* y, por el contrario, de suero de ovejas infectadas por cowdriosis con el antígeno MAP1-B de especies de *Ehrlichia* de la montaña Panola, lo cual impide su uso en la detección de la introducción de *E. ruminantium* en el continente americano (Sayler *et al.*, 2016). Hasta ahora, el ELISA con MAP1-B ha sido el de utilización más amplia y se describirá con detalle. Por tanto, la serología es poco fiable como instrumento para el diagnóstico de la detección de animales individuales específicamente expuestos a *E. ruminantium*. Debería considerarse la serología en una población, teniendo en cuenta la epidemiología, y complementarse, si fuera necesario, con técnicas moleculares.

#### 3.1. Enzimoinmunoanálisis con MAP1-B (Semu *et al.*, 2001)

Utilizando el vector pQE9, el fragmento de PCR MAP1-F2R2, que codifica los aminoácidos 47–152 de la proteína MAP1 que incluye la región inmunogénica MAP1-B, se expresa en *Escherichia coli* M15[pREP4] como una proteína de fusión que contiene seis residuos adicionales de histidina. La MAP1-B recombinante se purifica utilizando Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa (ácido nitrilotriacético-agarosa) bajo condiciones desnaturizantes como lo describe el fabricante. El antígeno se conserva a 4°C y se titula cada lote.

El antígeno se diluye a razón de 0,5 µg/ml en tampón carbonato sódico 0,05 M, pH 9,6, y se inmoviliza sobre placas de poliestireno mediante su incubación durante 1 hora a 37°C, y se guarda a 4°C hasta su uso. Sin embargo, en ensayos iniciales, una concentración de 2 µg/ml redujo el ruido de fondo y mejoró la especificidad (datos no mostrados: Semu *et al.*, 2001).

##### 3.2.1. Procedimiento analítico

- i) Las placas se bloquean durante 30 minutos añadiendo 100 µl por pocillo de PBS 0,1 M, pH 7,2, suplementado con Tween 20 al 0,1% (PBST) y leche desnatada deshidratada al 3% (PBSTM).

- ii) Se lavan las placas tres veces con PBS suplementado con Tween 20 al 0,1 % (PBST) y dos veces con agua destilada.
- iii) Se añaden en pocillos duplicados 100 µl de suero de la prueba diluidos al 1/100 en PBSTM, y se incuba durante 1 hora a 37°C.
- iv) Se lavan las placas tres veces en PBST y dos veces en agua destilada.
- v) Se añaden 100 µl por pocillo de IgG anti-especie conjugada con peroxidasa de rábano diluida óptimamente y se incuba la placa durante 1 hora a 37°C.
- vi) Después de lavar como en el paso (iv), cada pocillo se llena con 100 µl de tampón citrato 0,1M, pH 5,5, que contenga 0,5 mg/ml de ortofenilén-diamina y 3 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 9%.
- vii) La reacción se para después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente (20–25°C) añadiendo 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. La absorbancia se lee a 495 nm. Se incluyen controles positivos y negativos en cada placa.

### 3.2. Enzimoimmunoanálisis de competición con MAP1 (Mondry *et al.*, 1998)

*El antígeno recombinante MAP1 se prepara de la siguiente forma:* se infectan larvas del insecto *Trichoplusia* de 8 días por un baculovirus que expresa el gen *map1* y se homogeneizan las larvas moribundas (10% [p/v] en PBS suplementado con 0,001% (v/v) de Triton X-100.

*El MAb anti-MAP1 se prepara de la siguiente forma:* se funden con células SP2/0 células de bazo de ratón BALB/C previamente inoculadas con homogeneizado de larvas. Se analizan los sobrenadantes del cultivo celular del hibridoma para detectar la reactividad con MAP1 mediante los métodos de inmunotransferencia (immunoblotting) e inmunoperoxidasa. Se subclona un cultivo celular reactivo, se isotipifica y posteriormente se utiliza para la producción de MAb.

Después de una dilución posterior en PBS 1/800 (v/v), se inmoviliza el antígeno sobre placas de poliestireno (Placas polySorp Nunc-Inmuno) mediante incubación durante la noche a 4°C, y se conservan a –70°C.

#### 3.2.1. Procedimiento analítico

- i) Antes de su utilización, se bloquean las placas durante 30 minutos añadiendo 100 µl por pocillo de PBS, pH 7,2, suplementado con 0,05% de Tween 20 y 5% de leche desnatada deshidratada.
- ii) Se lavan las placas tres veces con PBS/Tween, se añaden 50 µl/pocillo de suero problema diluido a 1/50 en PBS suplementado con 0,05% de Tween 20 y 1% de leche seca desnatada (PBSTM) por duplicado y se incuban las placas durante 30 minutos a 37°C.
- iii) Sin ningún paso intermedio, se añaden 75 µl/pocillo de MAb diluido a 1/4.000 (v/v) en PBSTM y se incuban las placas durante otros 30 minutos a 37°C.
- iv) Se lavan las placas tres veces en PBS/Tween y se añaden 50 µl por pocillo de IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano diluida de forma óptima en PBSTM. La placa se incuba durante 1 hora a 37°C.
- v) Después de tres lavados como se describió anteriormente, se añaden a cada pocillo 100 µl de tampón citrato 0,1 M, pH 5,5, que contengan 0,5 mg/ml de O-fenilén diamina y 3 µl/ml de 9% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, se detiene la reacción añadiendo 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N y se lee la absorbancia a 495 nm. En cada placa se incluyen controles positivos y negativos.

### 3.3. Lectura de los resultados

Tanto el ELISA con MAP1-B como el C-ELISA con MAP1 han mostrado una gran especificidad después de su evaluación en el suero de 3.000 rumiantes (cabras, ovejas y ganado vacuno) recogidos de 14 islas de las Antillas Menores infectadas con *A. variegatum*, de las que solamente tres se sabe que están infectadas por *E. ruminantium* (Mondry *et al.*, 1998). La especificidad total calculada de las 11 islas sin cowdriosis fue 98,5% y 99,4% para el C-ELISA con MAP1 y el ELISA con MAP1-B, respectivamente. En otro estudio llevado a cabo en el Caribe, se obtuvieron resultados positivos en muestras de cuatro de seis islas libres de cowdriosis al utilizar ELISA MAP1-B (Kelly *et al.*, 2011). Además, también se ha descrito la elevada sero-prevalencia en áreas de Zimbabwe o de Sudáfrica que están libres de vectores pero no se ha explicado (podría estar originada por un agente con

reacción cruzada no transmitido por *Amblyomma*) y esto debería tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados (Kakono *et al.*, 2003).

La evaluación de la sensibilidad de las pruebas es más problemática, ya que requiere el conocimiento de la situación exacta de un número alto de animales muestreados en el campo. Como se mencionó anteriormente, en la actualidad no hay ninguna técnica sencilla disponible para confirmar si un animal está infectado. Desde el punto de vista experimental, se describió que la sensibilidad de C-ELISA en cabras era de 91,6–95,4% para el ELISA con MAP1-B, y de 96,3–96,9% para el C-ELISA con MAP1 (Mondry *et al.*, 1998). Sin embargo, en otro estudio, la sensibilidad media era del 95% para los valores de corte establecidos al 31% y 26,6% del suero control positivo para los sueros de ovejas y cabras, respectivamente (Mboloi *et al.*, 1999). De hecho, los cálculos se basan en un número limitado de animales inoculados experimentalmente en un periodo de tiempo inmediatamente después de la inoculación, cuando casi todos los animales son aún positivos. La sensibilidad en el ganado vacuno es incluso más baja y hay varios informes que demuestran que, después de la infección, la mayoría de los animales se convierten de nuevo en seronegativos en menos de 6 meses y algunos animales incluso nunca presentan seroconversión (Mahan *et al.*, 1998b; Semu *et al.*, 2001). Esta observación coincide con la diferencia en la prevalencia de anticuerpos observada entre los ruminantes pequeños y el ganado vacuno en inspecciones epidemiológicas que no se pueden explicar por un menor riesgo de infección de los últimos. Por ejemplo, en las granjas de Zimbabwe situadas en áreas endémicas, más del 90% de las cabras presentaban anticuerpos en su suero en comparación con el 33% del ganado vacuno mantenido en las mismas condiciones (Mahan *et al.*, 1998b). Se han hecho observaciones similares en el Caribe.

Las pruebas serológicas son útiles para la evaluación de la respuesta de anticuerpos a la cowdriosis en animales vacunados. Las pruebas no se deben utilizar para analizar animales antes de su importación a las áreas libres de cowdriosis. Los anticuerpos se mantienen a niveles detectables en los ruminantes domésticos infectados de forma natural, pero sólo durante unos pocos meses, y los anticuerpos circulantes desaparecen más rápidamente en el ganado vacuno que en los ruminantes pequeños. Por tanto, es posible que los animales que dan negativo en las pruebas serológicas puedan ser portadores de la infección. La serología debería considerarse, por tanto, como un método de diagnóstico solamente aplicable en las manadas y no en individuos (Peter *et al.*, 2001). En la interpretación del diagnóstico se deben considerar otros parámetros epidemiológicos.

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y EL MATERIAL DE DIAGNÓSTICO

No existe actualmente ninguna vacuna comercial. El único método de inmunización contra la cowdriosis es el método de 'infección y tratamiento' utilizando sangre infectada, seguido por el tratamiento de los animales infectados con tetraciclina. Este método se usa aún en varias zonas, pero es probable que sea reemplazado pronto por preparaciones inactivadas o atenuadas del microorganismo, cuya investigación ha dado resultados prometedores.

### 1. Vacunas inactivadas

La vacuna inactivada con cuerpos elementales de *E. ruminantium* inactivados o lisados químicamente, emulsificada en adyuvante oleoso, confirió buena protección contra la exposición a cepas homólogas y naturales (Adakal *et al.*, 2010b; Mahan *et al.*, 1998a; Marcelino *et al.*, 2015a; Martínez *et al.*, 1996). No obstante, no impide que animales vacunados desarrollen signos clínicos, y se observa morbilidad tras la exposición a cepas virulentas.

El desarrollo de un proceso de producción a gran escala y la optimización de las condiciones de conservación para la vacuna inactivada ha conducido a un descenso del coste de la dosis vacunal a 0,11 euros (Marcelino *et al.*, 2007; Peixoto *et al.*, 2005). En 2015, Marcelino *et al.* desarrollaron una vacuna inactivada lista para usar que podía utilizarse con facilidad en condiciones de campo. Se comprobó que incluso tras romper la cadena de frío exponiéndola durante 3 días a 37 °C, lo cual imitaría las condiciones de campo, conservaba la eficiencia (Marcelino *et al.*, 2015a). Este estudio mostró la robustez de la vacuna en condiciones de campo.

En Zimbabwe, los ensayos de campo con vacunas inactivadas emulsionadas en adyuvante ISA 50 han demostrado también capacidad de protección en las ovejas frente a la inoculación natural por garrapatas (Mahan *et al.*, 1998a). En ensayos experimentales más amplios realizados en el este y sur de África se ha logrado un descenso significativo de la mortalidad en las vacas, las cabras y las ovejas utilizando una cepa prototipo de Zimbabwe (la cepa Mbizi) o una cepa local procedente de las zonas de experimentación (Mahan *et al.*, 2001). Sin embargo, en tres de las cuatro zonas, la vacuna preparada con un aislamiento local fue menos efectiva que la vacuna con el prototipo Mbizi, lo que sugiere que hay una cobertura inadecuada del rango antigénico de las cepas presentes en cada zona. Los estudios sobre vacunación llevados a cabo en Burkina Faso mostraron un

aumento significativo en el efecto protector de la vacuna inactivada cuando se añadía una cepa local a la cepa vacunal Gardel (Adakal *et al.*, 2010b).

Parece clara la falta de protección entre las cepas de *E. ruminantium* debida a la diversidad genética o antigénica, pero se ha subestimado la complejidad de la estructura de la población de *E. ruminantium* en el campo. Se ha observado una gran diversidad genética de *E. ruminantium* en toda África, las islas del Caribe y el Océano Índico, lo cual genera el problema del efecto protector de la cepa vacunal contra las cepas naturales (Adakal *et al.*, 2010a; Cangi *et al.*, 2016; Raliniaina *et al.*, 2010). Incluso aunque se definiera la caracterización genética, falta un marcador genético asociado a la protección; además, es fundamental aislar cepas naturales *in vitro* para saber su capacidad de protección contra cepas heterólogas y ser capaz de mezclar varias cepas en la vacuna inactivada para cubrir ampliamente la variedad genética de las cepas naturales.

La vacuna inactivada se está desarrollando. Estas vacunas inactivadas no evitan la infección pero evitan o reducen la muerte en los animales vacunados cuando se exponen al agente vivo virulento. No obstante, una ventaja consiste en que se pueden incorporar varias cepas de campo para hacer que la vacuna tenga un espectro más amplio de protección.

Un desafío importante es la identificación de marcadores genéticos de *E. ruminantium* asociados a la protección, con el fin de identificar las cepas vacunales a incluir en la vacuna inactivada adaptada a una región.

## 2. Vacunas atenuadas

La infección de los ruminantes con cepas vivas de *E. ruminantium* induce una protección fuerte y duradera contra las cepas homólogas. Esto constituye la base del método de la "infección-y-tratamiento", en el que se utilizan cepas virulentas. Las cepas con una virulencia atenuada que no requiriesen el tratamiento de los animales serían ideales, pero se dispone de un número limitado de cepas de ese tipo. Se ha obtenido una cepa atenuada de Senegal que proporciona un 100% de protección contra el microorganismo homólogo letal pero muy poca protección contra una inoculación heteróloga. Se ha atenuado también la cepa Gardel, que confiere un nivel significativo de protección cruzada con otras varias cepas (aunque lejos de ser completa) (Marcelino *et al.*, 2015b). Se ha atenuado una tercera cepa llamada Welgevonden, de Sudáfrica, que proporciona una protección completa frente a cuatro cepas heterólogas bajo condiciones experimentales (Zweygarth *et al.*, 2005). No obstante, no se ha probado en condiciones de campo. El principal inconveniente de las vacunas atenuadas es su marcada labilidad, que requiere almacenamiento en nitrógeno líquido y su distribución en condiciones de congelación. Además, deben ser administradas por vía intravenosa. Además, también hay una posible reversión a la virulencia y, como es una vacuna viva, podría no utilizarse en zonas libres de cowdriosis. A pesar de los recientes esfuerzos por conocer el mecanismo de virulencia y atenuación (Marcelino *et al.*, 2015a), todavía se desconocen en gran medida independientemente de la cepa de la que se trate.

## 3. Vacunas recombinantes

Varios estudios describen una protección parcial en los ratones usando vacunas con ADN *map1* y una mejora de la protección mediante la vacunación siguiendo un protocolo de una primera inoculación (con plásmido) y otra de recuerdo (con MAP1 recombinante) (Nyika *et al.*, 2002). Sin embargo, no se ha demostrado la protección de los ruminantes mediante esta estrategia. Por el contrario, se ha descrito una protección importante en las ovejas contra las inoculaciones experimentales homólogas y heterólogas tras la vacunación con un plásmido usando un cocktail de cuatro ORF (fases de lectura abierta) del locus 1H12 del genoma de *E. ruminantium* (Collins *et al.*, 2003). No se han descrito resultados posteriores. Probablemente, las vacunas recombinantes no estarán disponibles en un futuro próximo. Se ha desarrollado una vacuna de ADN para primovacunación/de proteína recombinante para revacunación (Pretorius *et al.*, 2008). Se ha obtenido un efecto protector eficiente empleando un cóctel de cuatro marcos abiertos de lectura (ORF) ante la exposición a una cepa homóloga, pero la vacuna no dio resultados satisfactorios durante la exposición a la garrapata de campo. Además, una única inmunización intramuscular no es suficiente para inducir la protección. Para la primovacunación con ADN, es necesario el uso de una pistola génica, que no es adecuada para una campaña de vacunación a gran escala. Se ha identificado un gen polimórfico como componente eficiente de una vacuna recombinante contra la cowdriosis empleando el método de la primovacunación/revacunación (Pretorius *et al.*, 2010). No obstante, dado que este gen es polimórfico, una vacuna recombinante debería incluir al menos tres genotipos distintos.

## BIBLIOGRAFÍA

- ADAKAL H., GAVOTTE L., STACHURSKI F., KONKOBO M., HENRI H., ZOUNGRANA S., HUBER K., VACHIERY N., MARTINEZ D., MORAND S. & FRUTOS R. (2010a). Clonal origin of emerging populations of *Ehrlichia ruminantium* in Burkina Faso. *Infect. Genet. Evol.*, **10**, 903–912.
- ADAKAL H., MEYER D., CARASCO-LACOMBE C., PINARELLO V., ALLÈGRE F., HUBER K., STACHURSKI F., MORAND S., MARTINEZ D., LEFRANÇOIS T., VACHIÉRY N. & FRUTOS R. (2009). MLST scheme of *Ehrlichia ruminantium*: Genomic stasis and recombination in strains from Burkina-Faso. *Infect. Genet. Evol.*, **9**, 1320–1328.
- ADAKAL H., STACHURSKI F., KONKOBO M., ZOUNGRANA S., MEYER D., PINARELLO V., APRELON R., MARCELINO I., ALVES P.M., MARTINEZ D., LEFRANÇOIS T. & VACHIERY N. (2010b). Efficiency of inactivated vaccines against heartwater in Burkina Faso: Impact of *Ehrlichia ruminantium* genetic diversity. *Vaccine*, **28**, 4573–4580.
- BEKKER C.P., DE VOS S., TAOUFIK A., SPARAGANO O.A. & JONGEJAN F. (2002). Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. *Vet. Microbiol.*, **89**, 223–238.
- CANGI N., GORDON J.L., BOURNEZ L., PINARELLO V., APRELON R., HUBER K., LEFRANÇOIS T., NEVES L., MEYER D.F. & VACHIÉRY N. (2016). Recombination is a major driving force of genetic diversity in the Anaplasmataceae *Ehrlichia ruminantium*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **6**, 14 p. (eCollection 2016).
- CANGI N., PINARELLO V., BOURNEZ L., LEFRANÇOIS T., ALBINA E., NEVES L. & VACHIERY N. (2017). Efficient high-throughput method to detect *Ehrlichia ruminantium* in ticks. *Parasit. Vectors*, **10**, 566.
- COLLINS E.N., PRETORIUS A., VAN KLEEF M., BRAYTON K.A., ZWEYGARTH E. & ALLSOPP B. (2003). Development of improved vaccines for heartwater. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **990**, 474–484.
- FABURAY B., GEYSEN D., CEESAY A., MARCELINO I., ALVES P.M., TAOUFIK A., POSTIGO M., BELL-SAKYI L. & JONGEJAN F. (2007). Immunisation of sheep against heartwater in The Gambia using inactivated and attenuated *Ehrlichia ruminantium* vaccines. *Vaccine*, **25**, 7939–7947.
- KAKONO O., HOVE T., GEYSEN D. & MAHAN S. (2003). Detection of antibodies to the *Ehrlichia ruminantium* MAP1-B antigen in goat sera from three communal land areas of Zimbabwe by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **70**, 243–249.
- KELLY P.J., LUCAS H., YOWELL C., BEATI L., DAME J., URDAZ-RODRIGUEZ J. & MAHAN S. (2011). *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* and domestic ruminants in the Caribbean. *J. Med. Entomol.*, **48**, 485–488.
- LORUSSO V., WIJNVELD M., MAJEKODUNMI A.O., DONGKUM C., FAJINMI A., DOGO A.G., THRUSFIELD M., MUGENYI A., VAUMOURIN E., IGWEH A.C., JONGEJAN F., WELBURN S.C. & PICOZZI K. (2016). Tick-borne pathogens of zoonotic and veterinary importance in Nigerian cattle. *Parasit. Vectors*, **9**, 217.
- MAHAN S.M., KUMBULA D., BURRIDGE M.J. & BARBET A.F. (1998a). The inactivated *Cowdria ruminantium* vaccine for heartwater protects against heterologous strains and against laboratory and field tick challenge. *Vaccine*, **16**, 1203–1211.
- MAHAN S.M., SEMU S.M., PETER T.F. & JONGEJAN F. (1998b). Evaluation of the MAP1-B ELISA for cowdriosis with field sera from livestock in Zimbabwe. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **849**, 259–261.
- MAHAN S.M., SMITH G.E., KUMBULA D., BURRIDGE M.J. & BARBET A. (2001). Reduction in mortality from heartwater in cattle, sheep and goats exposed to field challenge using an inactivated vaccine. *Vet. Parasitol.*, **97**, 295–308.
- MARCELINO I., HOLZMULLER P., HOLZMULLER P., STACHURSKI F., RODRIGUES V. & VACHIÉRY N. (2016). *Ehrlichia ruminantium*: The Causal Agent of Heartwater. In: Rickettsiales: Biology, Molecular Biology, Epidemiology, and Vaccine Development, Part IV, Thomas S., ed. Springer International Publishing, Cham, Switzerland, 241–280.
- MARCELINO I., LEFRANÇOIS T., MARTINEZ D., GIRAUD-GIRARD K., APRELON R., MANDONNET N., GAUCHERON J., BERTRAND F. & VACHIÉRY N. (2015a). A user-friendly and scalable process to prepare a ready-to-use inactivated vaccine: the example of heartwater in ruminants under tropical conditions. *Vaccine*, **33**, 678–685.
- MARCELINO I., VACHIÉRY N., AMARAL A.I., ROLDAO A., LEFRANÇOIS T., CARRONDO M.J., ALVES P.M. & MARTINEZ D. (2007). Effect of the purification process and the storage conditions on the efficacy of an inactivated vaccine against heartwater. *Vaccine*, **25**, 4903–4913.
- MARCELINO I., VENTOSA M., PIRES E., MÜLLER M., LISACEK F., LEFRANÇOIS T., VACHIERY N. & COELHO A.V. (2015b). Comparative Proteomic Profiling of *Ehrlichia ruminantium* Pathogenic Strain and Its High-Passaged Attenuated Strain Reveals Virulence and Attenuation-Associated Proteins. *PLoS One*, **10**, e0145328.

- MARCELINO I., VERISSIMO C., SOUSA M.F., CARRONDO M.J. & ALVES P.M. (2005). Characterization of *Ehrlichia ruminantium* replication and release kinetics in endothelial cell cultures. *Vet. Microbiol.*, **110**, 87–96.
- MARTINEZ D., PEREZ J.M., SHEIKBOUDOU C., DEBUS A. & BENSARD A. (1996). Comparative efficacy of Freund's and Montanide ISA50 adjuvants for the immunisation of goats against heartwater with inactivated *Cowdria ruminantium*. *Vet. Parasitol.*, **67**, 175–184.
- MARTINEZ D., VACHIERY N., STACHURSKI F., KANDASSAMY Y., RALINIAINA M., APRELON R. & GUEYE A. (2004). Nested-PCR for detection and genotyping of *Ehrlichia ruminantium*. Use in genetic diversity analysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1026**, 106–113.
- MBOLOI M.M., BEKKER C.P.J., KRUITWAGEN C., GREINER M. & JONGEJAN F. (1999). Validation of the indirect MAP1-B Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of experimental *Cowdria ruminantium* infection in small ruminants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 66–72.
- MONDRY R., MARTINEZ D., CAMUS E., LIEBISCH A., KATZ J.B., DEWALD R., VAN VLIET A.H.M. & JONGEJAN F. (1998). Validation and comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to *Cowdria ruminantium* infection. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **849**, 262–272.
- NJIIRI N.E., BRONSVOORT B.M., COLLINS N.E., STEYN H.C., TROSKIE M., VORSTER I., THUMBI S.M., SIBEKO K.P., JENNINGS A., VAN WYK I.C., MBOLE-KARIUKI M., KIARA H., POOLE E.J., HANOTTE O., COETZER K., OOSTHUIZEN M.C., WOOLHOUSE M. & TOYE P. (2015). The epidemiology of tick-borne haemoparasites as determined by the reverse line blot hybridization assay in an intensively studied cohort of calves in western Kenya. *Vet. Parasitol.*, **210**, 69–76.
- NYIKA A., BARBET A.F., BURRIDGE M.J. & MAHAN S.M. (2002). DNA vaccination with map1 gene followed by protein boost augments protection against challenge with *Cowdria ruminantium*, the agent of heartwater. *Vaccine*, **20**, 1215–1225.
- PEIXOTO C.C., MARCELINO I., VACHIERY N., BENSARD A., MARTINEZ D., CARRONDO M.J.T. & ALVES P. (2005). Quantification of *Ehrlichia ruminantium* by real time PCR. *Vet. Microbiol.*, **107**, 273–278.
- PETER T.F., O'CALLAGHAN C.J., MEDLEY G.F., PERRY B.D., SEMU S.M. & MAHAN S.M. (2001). Population-based evaluation of the *Ehrlichia ruminantium* MAP 1B indirect ELISA. *Exp. Appl. Acarol.*, **25**, 881–897.
- PILET H., VACHIERY N., BERRICH M., BOUCHOUICHA R., DURAND B., PRUNEAU L., PINARELLO V., SALDANA A., CARASCO-LACOMBE C., LEFRANÇOIS T., MEYER D.F., MARTINEZ D., BOULOUIS H.J. & HADDAD N. (2012). A new typing technique for the *Rickettsiales Ehrlichia ruminantium*: multiple-locus variable number tandem repeat analysis. *J. Microbiol. Methods*, **88**, 205–211.
- POSTIGO M., BELL-SAKYI L., PAXTON E. & SUMPTION K. (2002). Kinetics of experimental infection of sheep with *Ehrlichia ruminantium* cultivated in ticks and mammalian cell lines. *Exp. Appl. Acarol.*, **28**, 187–193.
- PRETORIUS A., LIEBENBERG J., LOUW E., COLLINS N.E. & ALLSOPP B.A. (2010). Studies of a polymorphic *Ehrlichia ruminantium* gene for use as a component of a recombinant vaccine against heartwater. *Vaccine*, **28**, 3531–3539.
- PRETORIUS A., VAN KLEEF M., COLLINS N.E., TSHIKUDO N., LOUW E., FABER F.E., VAN STRIJP M.F. & ALLSOPP B.A. (2008). A heterologous prime/boost immunisation strategy protects against virulent *E. ruminantium* Welgevonden needle challenge but not against tick challenge. *Vaccine*, **26**, 4363–4371.
- RALINIAINA M., MEYER D., PINARELLO V., SHEIKBOUDOU C., EMBOULÉ L., KANDASSAMY Y., ADAKAL H., STACHURSKI F., MARTINEZ D., LEFRANÇOIS T. & VACHIERY N. (2010). Mining the genetic diversity of *Ehrlichia 1 ruminantium* using map genes family. *Vet. Parasitol.*, **167** (2–4), 187–195.
- SAYLER K.A., LOFTIS A.D., MAHAN S.M. & BARBET A.F. (2016). Development of a Quantitative PCR Assay for Differentiating the Agent of Heartwater Disease, *Ehrlichia ruminantium*, from the Panola Mountain *Ehrlichia*. *Transbound. Emerg. Dis.*, **63**, e260–e269.
- SEMU S.M., PETER T.F., MUKWEDEYA D., BARBET A.F., JONGEJAN F. & MAHAN S.M. (2001). Antibody responses to Map 1B and other *Cowdria ruminantium* antigens are down regulated in cattle challenged with tick-transmitted heartwater. *Clin. Diag. Immunol. Lab.*, **8**, 388–396.
- STEYN H.C., PRETORIUS A., MCCRINDLE C.M., STEINMANN C.M. & VAN KLEEF M. (2008). A quantitative real-time PCR assay for *Ehrlichia ruminantium* using pCS20. *Vet. Microbiol.*, **131**, 258–265.
- ZHANG J., KELLY P., GUO W., XU C., WEI L., JONGEJAN F., LOFTIS A. & WANG C. (2015). Development of a generic *Ehrlichia* FRET-qPCR and investigation of ehrlichioses in domestic ruminants on five Caribbean islands. *Parasit. Vectors*, **8**, 506.

ZWEYGARTH E., JOSEMANS A.I., VAN STRIJP M.F., LOPEZ-REBOLLAR L., VAN KLEEF M. & ALLSOPP B.A. (2005). An attenuated *Ehrlichia ruminantium* (Welgevonden stock) vaccine protects small ruminants against virulent heartwater challenge. *Vaccine*, **23**, 1695–1702.

\*

\* \*

**NB:** Existen un Laboratorio de Referencia de la OIE para la cowdriosis  
(puede consultarse la página web de la OIE:

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

Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la cowdriosis.

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.