

SECCIÓN 3.4.

BOVIDAE

CAPÍTULO 3.4.1.

ANAPLASMOSIS BOVINA

RESUMEN

Definición de la enfermedad: La anaplasmosis bovina está causada por la infección por *Anaplasma marginale*. Se conoce desde hace tiempo una segunda especie, *A. centrale*, que suele causar infecciones benignas. *Anaplasma marginale* es responsable de casi todos los brotes de la enfermedad clínica. *A. phagocytophilum* y *A. bovis*, que infectan al ganado vacuno, también se han incluido en el género *Anaplasma phagocytophilum* y puede causar una enfermedad autolimitante en los bovinos. No existen informes de enfermedad asociada a la infección por *A. bovis*. El microorganismo está clasificado en el género *Anaplasma*, perteneciente a la familia Anaplasmataceae, del orden Rickettsiales.

Descripción de la enfermedad: Los signos característicos de la anaplasmosis bovina son la anemia, ictericia en casos agudos y graves, y muerte inesperada. Otros signos son una pérdida rápida de la producción de leche y del peso, pero la enfermedad clínica solo se puede confirmar mediante identificación del microorganismo. Una vez infectado, el ganado puede permanecer toda la vida como portador, y la identificación de estos animales depende de la detección de anticuerpos específicos mediante pruebas serológicas, o del ADN de las rickettsias mediante técnicas de amplificación. La enfermedad suele transmitirse por garrapatas vector, pero también puede producirse una transmisión mecánica por picadura de insectos o por agujas.

Detección del agente: El examen microscópico de frotis de sangre u órganos con tinción de Giemsa es el método más común para identificar *Anaplasma* en animales con infección clínica. En estos frotis, aparecen las bacterias *A. marginale* dentro de los eritrocitos como cuerpos densos y redondeados de unos 0,3–1,0 μm de diámetro, situados en la zona marginal del eritrocito o en su proximidad. *Anaplasma centrale* tiene un aspecto similar, pero la mayor parte de los microorganismos se sitúan hacia el centro del eritrocito. Puede resultar difícil diferenciar entre *A. marginale* y *A. centrale* en un frotis teñido, sobre todo con bajos niveles de rickettsiemia. En algunos países existen tinciones comerciales que permiten una tinción muy rápida de *Anaplasma* spp. *Anaplasma phagocytophilum* solo se puede observar en granulocitos infectados, principalmente neutrófilos y *A. bovis* solo se pueden observar en monocitos infectados.

Es importante que los frotis se preparen bien y estén exentos de material extraño. Los frotis de muestras de ganado vacuno vivo deben prepararse, preferiblemente, con sangre obtenida de la vena yugular o de algún otro gran vaso. En el caso del diagnóstico postmórtem, los frotis deben proceder de órganos internos (como el hígado, el riñón, el corazón o los pulmones) y de la sangre retenida en vasos periféricos. Esto último es particularmente útil si el estado de descomposición, después de la muerte, es avanzado.

Pruebas serológicas: Un ensayo de inmunoenzimología de competición (C-ELISA) tiene buena sensibilidad en la detección de los animales portadores. La prueba de aglutinación en placa es la siguiente más utilizada. La prueba de fijación del complemento (CF) ya no se considera fiable debido a lo variable de su sensibilidad. La reacción cruzada entre distintas especies del género *Anaplasma* puede complicar la interpretación de las pruebas serológicas. En general, el C-ELISA tiene la mayor especificidad, y solo se ha descrito reactividad cruzada entre *A. marginale*, *A. centrale*, *A.*

phagocytophilum y Ehrlichia spp. Como alternativa, una prueba fiable que se utiliza en muchos laboratorios y que puede prepararse in situ para el diagnóstico sistemático de la anaplasmosis es un ELISA indirecto (I-ELISA). Por último, se ha desarrollado un ELISA sándwich de doble antígeno de desplazamiento para diferenciar entre anticuerpos contra A. marginale y contra A. centrale.

A menudo se utilizan pruebas basadas en el ácido nucleico en laboratorios de diagnóstico y de modo experimental, que son capaces de detectar la presencia de una infección moderada en el ganado vacuno portador y en las garrapatas que actúan como vectores. Se ha utilizado una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional anidada para identificar portadores de bajo nivel, aunque puede producirse amplificación inespecífica. Los ensayos de PCR en tiempo real tienen una sensibilidad analítica equivalente a la PCR convencional anidada y son preferibles en un entorno de diagnóstico para reducir el riesgo de contaminación por anidada.

Requisitos para las vacunas: En varios países se usan vacunas vivas para proteger el ganado vacuno contra la infección por anaplasmosis bovina. La vacuna que contiene A. centrale vivo se emplea más y confiere protección parcial contra las cepas virulentas de A. marginale. La vacunación contra A. centrale conduce a infección y persistencia a largo plazo en muchas reses. El ganado bovino vacunado suele quedar protegido contra la enfermedad por A. marginale, pero con la infección.

Se dispone de una vacuna contra Anaplasma centrale en forma refrigerada y congelada. El control de calidad es muy importante, ya que pueden estar presentes en el ganado vacuno donante otros agentes transmisibles por la sangre que pueden contaminar las vacunas y diseminarse ampliamente. Por esta razón, se recomienda la vacuna congelada, que permite un control de calidad posterior a la producción, lo que limita el riesgo de contaminación con otros agentes patógenos.

Las vacunas contra Anaplasma centrale no son completamente inocuas. Una recomendación práctica es restringir su uso, en la medida de lo posible, a terneros, pues la inmunidad inespecífica reducirá el riesgo de algunas reacciones vacunales que pueden requerir un tratamiento con tetraciclina o imidocarb. Aparece inmunidad parcial en 6–8 semanas y dura varios años después de una única vacunación. En los países en que A. centrale es exótico, no puede utilizarse como vacuna contra A. marginale.

A. INTRODUCCIÓN

Los brotes de anaplasmosis bovina se deben a la infección por *Anaplasma marginale*. *Anaplasma centrale* puede causar una anemia moderada, pero los brotes clínicos en el campo son extremadamente infrecuentes. Otros miembros de la familia Anaplasmatacea que infectan al ganado bovino son *A. phagocytophilum* y *A. bovis* (Dumler et al., 2001). *Anaplasma phagocytophilum* tiene un amplio rango de hospedadores y causa las enfermedades anaplasmosis granulocítica humana (HGE), anaplasmosis granulocítica equina (EGA) y anaplasmosis granulocítica canina (CGA), en humanos, caballos y perros, respectivamente (Matei et al., 2019). En el norte de Europa, *A. phagocytophilum* causa fiebre transmitida por garrapatas, que afecta principalmente a los corderos. En el ganado vacuno, se han notificado infecciones por *A. phagocytophilum* en muchas regiones geográficas, sin embargo, la asociación a la enfermedad se notifica con menos frecuencia. La enfermedad clínica natural notificada en Alemania se caracterizaba por fiebre (39,5–41,7 °C), reducción repentina de la producción de leche, edema de las extremidades inferiores y rigidez con leucopenia, eritropenia, neutropenia, linfocitopenia y monocitopenia. Los animales afectados se recuperaron sin tratamiento (Silaghi et al., 2018).

Los signos clínicos más destacados de la anaplasmosis bovina son la anemia y la ictericia, y esta última tiene lugar en casos agudos graves o al final de la enfermedad. No hay hemoglobinemia ni hemoglobinuria, lo cual puede ayudar a diferenciar la anaplasmosis bovina de la babesiosis, que a menudo es endémica en las mismas zonas. De todas formas, la anaplasmosis solo se puede confirmar mediante identificación del microorganismo en los eritrocitos del animal afectado. Debe tenerse precaución si se utilizan únicamente técnicas de ácidos nucleicos para diagnosticar *A. marginale* en bovinos anémicos. La infección persistente de bajo nivel puede detectarse mediante estas técnicas y puede conducir a un diagnóstico erróneo de anaplasmosis bovina. Por lo tanto, la visualización de los cuerpos de *A. marginale* en los eritrocitos es necesaria para la confirmación.

Anaplasma marginale se presenta en la mayor parte de los países tropicales y subtropicales y está ampliamente distribuido, en regiones templadas. *Anaplasma centrale* se describió por vez primera vez en Sudáfrica. Desde

entonces, este microorganismo ha sido importado por otros países –como Australia y algunos países de Sudamérica, Sudeste asiático y Oriente Medio– para ser utilizado como vacuna contra *A. marginale*.

Las especies de *Anaplasma*, aunque descritas originalmente como parásitos protozoarios, son bacterias gramnegativas intracelulares obligadas. Según la taxonomía establecida en 2001 (Dumler et al., 2001), la familia *Anaplasmataceae* (orden *Rickettsiales*) se compone de cinco géneros: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Wolbachia* y *Aegyptianella*. El género *Anaplasma* contiene *Anaplasma marginale* como especie tipo, *A. centrale*, *A. phagocytophilum*, el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana (antes *Ehrlichia phagocytophila* y *E. equi*), *A. platys*, y *A. bovis* (antes *E. bovis*).

Las especies de *Anaplasma* se transmiten por vía mecánica o biológica a través de vectores artrópodos. La detección de ADN patógeno dentro de una garrapata es insuficiente para determinar la capacidad de una determinada especie de garrapata para transmitir un agente patógeno. Los estudios que demuestran la transmisión del agente patógeno son fundamentales para determinar el papel potencial de una especie concreta de garrapata en la transmisión del agente patógeno. Muchos estudios han demostrado la capacidad de transmisión de *Dermacentor andersoni*, *D. variabilis* y *D. albipictus*. Además, la transmisión por múltiples especies de *Rhipicephalus* está bien reconocida, incluyendo *R. annulatus*, *R. bursa*, *R. calcaratus*, *R. decoloratus*, *R. evertsi*, *R. microplus* y *R. sanguineus*. Es probable que otras especies de *Rhipicephalus* también sirvan como vectores biológicos de *A. marginale*. Se ha informado ampliamente de la presencia de ADN de *Anaplasma marginale* en especies de *Hyalomma*, y se ha demostrado la transmisión con *H. excavatum*. Es probable que múltiples especies de *Hyalomma* también sirvan como vectores de *A. marginale* (Shkap et al., 2009).

La transmisión intraestadial o transestadial puede ocurrir, incluso en las especies de *Rhipicephalus* de un solo hospedador. Las garrapatas macho pueden ser particularmente importantes como vectores ya que lo más probable es que se desplacen entre el ganado en busca de garrapatas hembra. La demostración experimental de la implicación de un vector no implica necesariamente que intervenga en la transmisión en condiciones de campo. Sin embargo, las especies de *Rhipicephalus* son claramente vectores importantes de la anaplasmosis en Australia, muchas regiones de África y Latinoamérica. *Dermacentor* spp. son vectores eficientes en EE.UU.

Se ha observado que otros artrópodos picadores intervienen como vectores mecánicos, en concreto en EE.UU. Se ha demostrado la transmisión experimental con ciertas especies de *Tabanus* (tábanos) y con mosquitos del género *Psorophora*. La importancia de los insectos picadores en la transmisión natural de la anaplasmosis parece variar mucho de una región a otra. *Anaplasma marginale* puede transmitirse también con facilidad durante la vacunación contra otras enfermedades, a menos que se utilice una aguja nueva o esterilizada para inyectar a cada animal. Se ha descrito una transmisión similar por medio de instrumentos quirúrgicos no esterilizados (Reinbold et al., 2010a).

El único vector de *A. centrale* conocido es *R. simus*, endémico de África. Aunque se han llevado a cabo múltiples estudios de transmisión, no hay evidencias de que la garrapata común de los bóvidos (*R. microplus*) pueda servir como vector de *A. centrale*. Esto es relevante porque *A. centrale* se utiliza como vacuna en regiones infestadas por *R. microplus*.

La infección por *Anaplasma marginale* no se ha observado en seres humanos. Hay muy poco riesgo de transmisión a operarios de campo a partir de laboratorios que trabajen con *A. marginale*. No obstante, el agente debe manipularse con los procedimientos de bioseguridad y contención adecuados, según determine el análisis de biorriesgos (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioseguridad: Normas para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y las instalaciones para animales*).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina y su propósito

Método	Finalidad					
	Demostrar ausencia de circulación del virus en la población ^(a)	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos ^(b)	Contribuir a las políticas de erradicación ^(c)	Confirmar casos clínicos ^(d)	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia ^(e)	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación ^(f)
Examen microscópico	-	--	-	+++	-	-
Detección del agente^(g)						
PCR	-	+++	-	+++	-	-
Detección de la respuesta inmunitaria						
CAT ^(h)	-	-	-	-	+-	+
C-ELISA ^(h)	+++	+	+++	-	+++	+++
IFAT ^(h)	+	-	-	-	++	++
ddasELISA						

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado, pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; - = no adecuado para este propósito.

Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido validadas formalmente, su uso sistemático y el hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hace aceptables.

CAT = prueba de aglutinación en placa; CF = fijación del complemento; ELISA = enzimoimmunoanálisis; IFA = prueba de la inmunofluorescencia indirecta; PCR = reacción en cadena de la polimerasa.

^(a)Véase el Apéndice 1 de este capítulo la table de justificación de las puntuaciones dadas a las pruebas para esta finalidad.

^(b)Véase el apéndice 2 de este capítulo la table de justificación de las puntuaciones dadas a las pruebas para esta finalidad.

^(c)Véase el apéndice 3 de este capítulo la table de justificación de las puntuaciones dadas a las pruebas para esta finalidad.

^(d)Véase el apéndice 4 de este capítulo la table de justificación de las puntuaciones dadas a las pruebas para esta finalidad.

^(e)Véase el apéndice 5 de este capítulo la table de justificación de las puntuaciones dadas a las pruebas para esta finalidad.

^(f)Véase el apéndice 6 de este capítulo la table de justificación de las puntuaciones dadas a las pruebas para esta finalidad.

^(g)Se recomienda utilizar una combinación de métodos de identificación del agente aplicados a cada muestra clínica.

^(h)Estas pruebas no distinguen entre animales infectados y vacunados.

1. Identificación del agente etiológico

1.1. Examen microscópico

Las muestras obtenidas a partir de ganado vacuno vivo deben incluir frotis de gota fina de sangre y sangre recogida con anticoagulante. Los frotis de gota fina, secados con aire, se mantienen de modo satisfactorio a temperatura ambiente por lo menos 1 semana. Las muestras de sangre con coagulante deben mantenerse a 4°C, a menos que puedan llegar al laboratorio en unas pocas horas. Esta muestra es útil para preparar frotis frescos si los anteriores no fueran satisfactorios. Además, un hematocrito bajo o un recuento de eritrocitos bajo puede ayudar a poner de manifiesto la implicación de *A. marginale* cuando en los frotis se detecta solo un bajo número de bacterias, especialmente en la fase de recuperación de la enfermedad.

Contrariamente a lo que ocurre con *Babesia bovis*, los eritrocitos infectados por *A. marginale* no se acumulan en los capilares, de modo que es apropiada la sangre de la yugular u otro gran vaso. *Anaplasma marginale* se replica en los eritrocitos formando pequeñas colonias unidas a la membrana, denominadas cuerpos de inclusión. Estos cuerpos de inclusión se pueden visualizar en un frotis sanguíneo, pero son pequeños y se confunden fácilmente con detritos o precipitado de la tinción (véase la Figura 1).

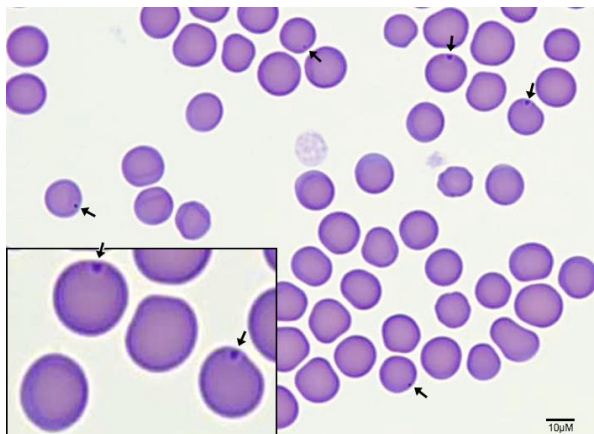


Fig. 1. Cuerpos de inclusión de *Anaplasma marginale*. Frotis sanguíneo teñido de un bovino infectado experimentalmente con *A. marginale*. Las flechas señalan los cuerpos de inclusión de *A. marginale*. Foto de S. Noh.

Las muestras obtenidas de los animales muertos deben ser frotis de gota fina secados al aire, del hígado, riñón, corazón y pulmones y de un vaso sanguíneo periférico. Este último se recomienda, en particular, si hay un retraso notable antes del examen postmortem porque, en tales circunstancias, la contaminación bacteriana en los frotis de los órganos a menudo comporta una identificación ambigua de *A. marginale*. Los frotis de encéfalo, que son útiles en el diagnóstico de algunas formas de babesiosis, no tienen un valor directo en el diagnóstico de la anaplasmosis, aunque deben incluirse para el diagnóstico diferencial cuando sea pertinente.

Para la preparación de los frotis se requiere la sangre de órganos, mejor que los tejidos de los órganos *per se*, porque el objetivo es ser capaz de examinar al microscopio los eritrocitos intactos para detectar la presencia de colonias de *A. marginale*. Los frotis de sangre derivada de órganos se mantienen satisfactoriamente durante varios días a temperatura ambiente.

Los frotis tanto de sangre como de órganos pueden teñirse con tinción de Giemsa al 10% durante 30 minutos aproximadamente tras fijarse durante 1 minuto con metanol absoluto. Después de la tinción, los frotis se lavan tres o cuatro veces con agua de grifo para eliminar el exceso de colorante y luego se secan al aire. Las condiciones para la tinción de Giemsa varían de un laboratorio a otro, pero para la dilución del stock de Giemsa no se recomienda agua destilada. El agua debe tener un pH de entre 7,2 y 7,4 para lograr una mejor resolución en la tinción de Giemsa. En algunos países se dispone de colorantes comerciales que proporcionan una tinción rápida de *A. marginale*. Los frotis se deben examinar con el objetivo de aceite de inmersión a 700–1.000 aumentos.

Los cuerpos de inclusión de *Anaplasma marginale* son redondeados y se tiñen intensamente, y miden unos 0,3–1,0 μm de diámetro. La mayor parte de estos cuerpos se localizan en el margen del eritrocito o en su proximidad. Esta característica diferencia *A. marginale* de *A. centrale*, ya que en este último caso los microorganismos están más centrados en el eritrocito. Sin embargo, sobre todo en casos de niveles bajos de rickettsiemia, puede resultar difícil la diferenciación de estas dos especies en los frotis. En algunas cepas de *A. marginale* se han descrito apéndices asociados a los cuerpos de inclusión de *Anaplasma*.

El porcentaje de eritrocitos infectados varía según la fase y la gravedad de la enfermedad. Con *A. marginale* pueden presentarse rickettsiemias máximas de más del 50%. Durante los periodos de alta rickettsiemia, son frecuentes las infecciones múltiples de eritrocitos individuales.

La infección se hace visible al microscopio 2–6 semanas después de la transmisión. Durante la enfermedad clínica, la rickettsiemia prácticamente se duplica cada día hasta los 10 días, y luego decrece a una velocidad similar. Puede persistir durante algunas semanas una anemia intensa después de que las bacterias lleguen a ser casi indetectables en los frotis de sangre. Después de la recuperación de la infección inicial, la mayor parte del ganado vacuno permanece con infección latente durante el resto de su vida.

1.2. Reacción en cadena de la polimerasa

Se han desarrollado pruebas basadas en los ácidos nucleicos para detectar *A. marginale* en el ganado vacuno infectado, aunque todavía no están totalmente validadas. La sensibilidad analítica de los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha estimado que es del 0,0001% de los eritrocitos infectados, pero a este nivel solo se detectaría una parte del ganado portador. Se ha utilizado una técnica PCR anidada para identificar al ganado portador de *A. marginale*, con capacidad de identificar apenas 30 eritrocitos infectados por ml de sangre, que está muy por debajo de los niveles más bajos en los portadores. Sin embargo, la PCR anidada lleva mucho tiempo, ya que requiere dos reacciones de PCR completas, y plantea importantes problemas de control de calidad para su uso rutinario (Torioni De Echaide et al., 1998). Se ha informado de que los ensayos de PCR en tiempo real alcanzan un nivel de sensibilidad analítica equivalente a la PCR anidada y deberían considerarse en lugar de la PCR anidada (Carelli et al., 2007; Decaro et al., 2008). Las ventajas de la PCR en tiempo real, que utiliza un único tubo cerrado para la amplificación y el análisis, son la reducción del riesgo de contaminación del amplicón y un resultado semicuantitativo de la prueba. El equipo y los reactivos necesarios para la PCR en tiempo real son caros y pueden estar fuera del alcance de algunos laboratorios.

Los ensayos más citados para la detección de *A. marginale* en animales individuales utilizan una sonda para aumentar la especificidad y están diseñados para detectar *msp1b* (Carelli et al., 2007) o *msp5* (Futse et al., 2003) en ADN genómico extraído de sangre entera. El ensayo basado en la detección de *msp1b* se ha validado parcialmente para detectar el agente patógeno en animales individuales y se utilizó para definir muestras para la validación de un ELISA-C (Carelli et al., 2007; Chung et al., 2014). El rendimiento analítico de este ensayo es sólido, y las pruebas de exclusividad confirmaron que no se detectaron otras bacterias ni protozoos patógenos del ganado transmitidos por garrapatas. El ensayo, evaluado utilizando 51 muestras de sangre de 18 rebaños de ganado vacuno en tres regiones del sur de Italia, tuvo una concordancia del 100% con la PCR anidada.

Msp1b es una familia multigénica. Basándose en la anotación de la cepa St. Maries de *A. marginale*, los cebadores y la sonda diseñados amplificarán múltiples miembros de esta familia de genes, incluidos *msp1b-1*, *msp1b-2* y *msp1-pg3*. Esto puede ayudar a aumentar la sensibilidad del diagnóstico, pero puede plantear problemas si se desea cuantificar el patógeno. Además, algunas cepas de *A. marginale* presentan polimorfismos de un solo nucleótido en *msp1b* dentro de las regiones de unión del cebador y la sonda. Por lo tanto, si se utiliza *msp1b* como diana de diagnóstico, el diseño del cebador y de la sonda debe tener en cuenta las cepas locales de *A. marginale*. *Msp1b* tiene la ventaja como diana de que los ortólogos de esta familia de genes están ausentes en las especies relacionadas de *A. phagocytophilum* y *Ehrlichia*, incluida *E. ruminantium*, lo que ayuda a garantizar la especificidad de la prueba.

Msp5 también se ha utilizado como diana para detectar *A. marginale* en ganado vacuno en muestras de campo y, con mayor frecuencia, en muestras experimentales (Futse et al., 2003). *Msp5* está muy conservado entre las cepas de *A. marginale* y es un gen de copia única, por lo que ofrece algunas ventajas como diana para garantizar la detección de cepas ampliamente variantes de *A. marginale*. Sin embargo, las cepas relacionadas *Anaplasma* spp. y *Ehrlichia* spp. tienen todos ortólogos *msp5* con un 50% de identidad con un gen de *E. ruminantium* (acceso NCBI: L07385.1), por lo que la especificidad debe determinarse en muestras de laboratorio y de campo. Además, se han realizado pocos trabajos para validar una prueba de PCR en tiempo real basada en *msp5* con fines de diagnóstico.

Se ha diseñado un tercer conjunto de cebadores-sonda para detectar *A. marginale* mediante PCR con transcripción inversa en tiempo real. Los cebadores amplifican un segmento del gen 16sRNA de *A. marginale* y *A. phagocytophilum*, mientras que la sonda diferencia entre las dos especies (Reinbold et al., 2010b). El rendimiento analítico de este ensayo es robusto. Sin embargo, no se han evaluado la sensibilidad diagnóstica, la especificidad y, de particular importancia con las pruebas basadas en la secuencia 16sRNA, la exclusividad para otros agentes patógenos transmitidos por garrapatas del

ganado bovino. Además, este ensayo está diseñado para su uso tras la extracción de ARN y la transcripción inversa, que es más laboriosa y costosa que la extracción de ADN. El ARN bacteriano se degrada rápidamente, lo que en última instancia puede reducir la sensibilidad diagnóstica de este ensayo.

En las regiones que utilizan *A. centrale* como vacuna, puede ser útil diferenciar entre animales infectados/vacunados con *A. marginale* y *A. centrale*. La PCR es la más adecuada para esta tarea. El ensayo de PCR en tiempo real desarrollado por Carelli et al. también puede utilizarse en una reacción dúplex para detectar y diferenciar entre *A. centrale* y *A. marginale* (Decaro et al., 2008). Los cebadores y la sonda se han diseñado para amplificar específicamente una región de *groEL* de *A. centrale*, pero no la *groEL* de *A. marginale*, a pesar de la identidad de secuencia del 97% entre los dos genes. Los cebadores y sondas específicos de *A. marginale* tienen un rendimiento similar en la PCR simple y dúplex (Carelli et al., 2007). Utilizando las mismas 51 muestras de campo de bovinos en Italia, el ensayo de *A. centrale* tuvo una menor sensibilidad analítica en comparación con la PCR anidada y discordancia en 4 de 51 muestras entre una prueba de inmunotransferencia de línea inversa de *A. centrale* y el ensayo de PCR dúplex.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en PCR para detectar *A. marginale* y *A. centrale*

Prueba	Referencia	Oligonucleótidos ^(a)	Secuencia 5'-3' ^(b)	Tamaño del amplicón (pb)	Número de acceso a NCBI
PCR en tiempo real	Carelli et al., 2007	<i>Am_msp1b_F</i>	TTG-GCA-AGG-CAG-CAG-CTT	95	M59845
		<i>Am_msp1b_R</i>	TTC-CGC-GAG-CAT-GTG-CAT		
		<i>Am_msp1b_PB</i>	TCG-GTC-TAA-CAT-CTC-CAG-GCT-TTC-AT		
PCR en tiempo real	Futse et al., 2003	<i>Am_msp5_F</i>	GCC-AAG-TGA-TGG-TGA-TAT-CGA	151	M93392
		<i>Am_msp5_R</i>	AGA-ATT-AAG-CAT-GTG-ACC-GCT-G		
		<i>Am_msp5_PB</i>	AAC-GTT-CAT-GTA-CCT-CAT-CAA		
PCR en tiempo real con transcripción inversa	Reinbold et al., 2010	<i>16S rRNA_F</i> ^(c)	CTC-AGA-ACG-AAC-GCT-GG	142	M60313
		<i>16S rRNA_R</i> ^(c)	CAT-TTC-TAG-TGG-CTA-TCC-C		
		<i>Am_16S rRNA_PB</i> ^(d)	CGC-AGC-TTG-CTG-CGT-GTA-TGG-T		
PCR en tiempo real ^(d)	Decaro et al., 2008	<i>Ac_groEL_F</i> ^(e, f)	CTA-TAC-ACG-CTT-GCA-TCT-C	77	CP001759.1
		<i>Ac_groEL_R</i> ^(e, f)	CGC-TTT-ATG-ATG-TTG-ATG-C		
		<i>Ac_groEL_PB</i> ^(e, f)	TCA-TCA-TTC-TTC-CCC-TTT-ACC-TCG-T		

^(a)Am indica *A. marginale*, Ac indica *A. centrale*, Pb indica la secuencia de la sonda.

^(b)Fluoróforos y *quenchers* no incluidos en las secuencias de sonda.

^(c)Amplifica el gen 16S rRNA de *A. phagocytophilum* y *A. marginale*.

^(d)La sonda es específica para el gen 16S ARNr de *A. marginale*.

^(e)Puede utilizarse como PCR dúplex con cebadores *msp1b* y sonda basada en Carelli et al., 2007.

^(f)Los cebadores y la sonda amplifican *groEL* de *A. centrale*.

2. Pruebas serológicas

Por lo general, a no ser que los animales hayan sido tratados o se encuentren en una fase muy inicial de la infección (<14 días), en la mayoría de los laboratorios los métodos de elección para identificar los animales infectados son el enzoinmunoanálisis de competición (C-ELISA), el ELISA indirecto (I-ELISA) o la prueba de aglutinación en placa (CAT) (ver más adelante). Las infecciones por *Anaplasma* persisten normalmente durante toda la vida del animal. Sin embargo, excepto en pequeños recrudescimientos ocasionales, no se puede detectar fácilmente cuerpos de inclusión de *A. marginale* en frotis de sangre después de una rickettsiemia aguda y es posible que ni siquiera una PCR a punto final pueda detectar la presencia del agente patógeno en muestras de sangre de portadores asintomáticos. Por tanto, se han desarrollado varias pruebas serológicas con objeto de detectar los animales con infección persistente.

Una característica del diagnóstico serológico de la anaplasmosis son los resultados tan variables que se han descrito por distintos laboratorios en muchas pruebas respecto a la sensibilidad y la especificidad. Esto se debe, al menos en parte, a una insuficiente validación de las pruebas en las que se emplea una cantidad considerable de animales que se sabe que son positivos o negativos. Una excepción es la técnica C-ELISA (ver más adelante), que inicialmente se validó utilizando animales verdaderamente positivos y negativos, definidos mediante la PCR anidada (Torioni De Echaide *et al.*, 1998). Y se actualizó en 2014 (Chung *et al.*, 2014). Por consiguiente, aunque la mayor parte de las pruebas descritas en este apartado son útiles para obtener datos epidemiológicos de una base amplia, se debe tener precaución en lo que respecta a su uso para la certificación de la enfermedad. El C-ELISA, el I-ELISA y la prueba de aglutinación en placa se describen a continuación de forma detallada.

Debe advertirse que en las pruebas serológicas existe un grado alto de reacciones cruzadas entre *A. marginale* y *A. centrale*, así como reactividad cruzada tanto con *A. phagocytophilum* como con *Ehrlichia* spp. (Al-Adhami *et al.*, 2011; Dreher *et al.*, 2005). Aunque las especies patógenas se pueden identificar a veces con antígenos de la especie homóloga o heteróloga, en muchas ocasiones se obtienen resultados equívocos. Se han realizado esfuerzos para desarrollar pruebas que diferencien entre la inmunidad adquirida de forma natural frente a *A. marginale* y la inmunidad adquirida mediante vacunación debida a la inmunización con *A. centrale* (Bellezze *et al.*, 2023; Sarli *et al.*, 2020).

2.1. Enzoinmunoanálisis de competición

La proteína principal de superficie 5 (MSP5) es una proteína inmunodominante expresada por *A. marginale*, *A. ovis* y *A. centrale*. En *A. marginale*, el gen está muy conservado, lo que la convierte en una diana útil en amplias regiones geográficas con una gran diversidad de cepas de *A. marginale* (Knowles *et al.*, 1996; Torioni De Echaide *et al.*, 1998). Así, un ELISA-C basado en la expresión recombinante (rMSP5) en combinación con un anticuerpo monoclonal (mAb) específico de MSP5 ha demostrado ser muy sensible y específico para la detección de animales infectados por *Anaplasma* (Molloy *et al.*, 1999; Reinbold *et al.*, 2010b; Strik *et al.*, 2007). Además, *A. ovis* y *A. centrale*, expresan MSP5 y los animales infectados producen anticuerpos contra el epítipo inmunodominante reconocido por el mAb específico de MSP5 utilizado en el C-ELISA. Este C-ELISA se actualizó en 2014 para mejorar el rendimiento mediante el uso de glutatión S-transferasa (GST) en lugar de proteína de unión a maltosa (MBP) como la etiqueta en el rMSP5 (Chung *et al.*, 2014). Este ensayo ya no requiere adsorción para eliminar los anticuerpos dirigidos contra la MBP, por lo que es más rápido y sencillo que la versión anterior del C-ELISA. La sensibilidad diagnóstica es del 100% y la especificidad diagnóstica es del 99,7% utilizando un punto de corte del 30% de inhibición según lo determinado por el gráfico de características operativas del receptor (ROC) (Chung *et al.*, 2014). Para esta validación, 385 sueros definidos como negativos procedían de ganado lechero mantenido en instalaciones libres de garrapatas de granjas sin antecedentes clínicos de anaplasmosis bovina. Los 135 sueros positivos procedían de ganado positivo para *A. marginale* mediante PCR anidada y serología).

Un estudio sugirió que los anticuerpos de bovinos infectados experimentalmente con *A. phagocytophilum* darán positivo en la prueba ELISA-C (Dreher *et al.*, 2005). Sin embargo, en otro estudio no se pudo demostrar reactividad cruzada, y el mAb utilizado en el ensayo no reaccionó con *A. phagocytophilum* MSP5 en ensayos de unión directa (Strik *et al.*, 2007). Se ha demostrado la reactividad cruzada entre *A. marginale* y *Ehrlichia* sp. BOV2010 aislada en Canadá, en ganado infectado de forma natural y experimental (Al-Adhami *et al.*, 2011).

Los resultados de la prueba utilizando el C-ELISA rMSP5 están disponibles en menos de 2-horas. Existe un kit de prueba comercial que contiene instrucciones específicas. Los usuarios deben seguir las instrucciones del fabricante.

2.2. Enzoinmunoanálisis indirecto

Primero se desarrolló una I-ELISA utilizando el antígeno CAT, que es un lisado crudo de *A. marginale* (véase más abajo). La prueba puede realizarse cuando no se dispone de la prueba ELISA-C comercial. A diferencia de la C-ELISA, la mayoría de los reactivos, como tampones y sustratos listos para disolver, están disponibles comercialmente en muchos países. Cualquier laboratorio puede preparar el antígeno utilizando cepas locales de *A. marginale*, aunque no se han desarrollado métodos estandarizados. I-ELISA utiliza pequeñas cantidades de suero y antígeno que pueden prepararse en cada laboratorio. La sensibilidad y especificidad de la prueba es del 87,3% y del 98,4-99,6% respectivamente, aunque varía

según el laboratorio (Nielsen *et al.*, 1996). Para los métodos generales, véase Barry *et al.* (1986). Para cada laboratorio, debe optimizarse la cantidad específica de antígeno para obtener la mejor lectura y el menor gasto.

Como alternativa, puede utilizarse rMSP5 como antígeno en esta prueba. Esto elimina la necesidad de preparación y estandarización del antígeno derivado de animales esplenectomizados e infectados por *A. marginale* (Silva *et al.*, 2006). En una comparación entre I-ELISA utilizando el antígeno CAT y rMSP con una etiqueta de histidina (rMSP5-HIS), estos dos I-ELISA tuvieron un rendimiento idéntico. En esta comparación, se utilizó la IFAT como prueba de referencia (Silva *et al.*, 2006).

Los resultados del I-ELISA pueden leerse en 4 a 5 horas. En general, se lleva a cabo como sigue:

2.2.1. Reactivos de la prueba

Se recubre una placa de microtitulación de 96 pocillos con antígeno *A. marginale*,
tampón PBS/Tween, (PBS 0,1 M, pH 7,2, Tween 20 al 0,05%),
reactivo de bloqueo (por ejemplo, leche en polvo desnatada comercial)
Tampón Tris 0,1 M, MgCl₂, 0,1 M, NaCl 0,005 M, pH 9,8
Sustrato *p*-nitrofenil fosfato disódico hexahidratado
Controles positivo y negativo.

2.2.2. Procedimiento analítico (esta prueba se lleva a cabo por triplicado)

- i) Las placas se preparan con antelación y se guardan en condiciones herméticas a -20°C.
- ii) Se retira con cuidado el envoltorio de plástico antes de utilizar las placas, con cuidado de no tocar el fondo de las mismas, puesto que ello podría distorsionar la lectura de la densidad óptica.
- iii) Se retira la tapa y se depositan 200 µl de solución PBST20 en cada pocillo, y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA).
- iv) Se disuelven 1,1 g de leche desnatada (con agente bloqueante) por cada placa, en 22 ml de PBST20.
- v) Se retira el contenido de la placa y se depositan en cada pocillo 200 µl de solución bloqueante, se vuelve a colocar la tapa y se incuba 60 minutos a 37°C.
- vi) Se lava la placa tres veces durante 5 minutos con PBST20.
- vii) Se diluyen todas las muestras de suero, incluidos los controles, a 1/100 en solución PBST20;
- viii) Se retira el contenido de la placa y se depositan 200 µl de suero diluido en cada uno de los tres pocillos para cada dilución, empezando con los controles positivo y negativo, y el blanco.
- ix) Se incuba la placa tapada a 37°C durante 60 minutos.
- x) Se lava tres veces como se ha descrito en el punto vi.
- xi) Se diluye a 1/1000 un conjugado de anticuerpo anti-IgG bovina a fosfatasa alcalina en solución PBST20; se añaden 200 µl del conjugado diluido por pocillo; se incuba la placa tapada a 37°C durante 60 minutos.
- xii) Se retira la tapa y se lava tres veces como se describe en el punto vi.
- xiii) Se retira el contenido de la placa y se depositan 195 µl de *p*-nitrofenil fosfato disódico hexahidratado al 0,075% en tampón Tris en cada pocillo, y se incuba durante 60 minutos a 37°C
- xiv) La reacción se cuantifica mediante un espectrofotómetro lector de microplaca, ajustado a 405 nm de longitud de onda. Los datos se expresan en forma de densidad óptica (DO).

2.2.3. Análisis de los datos

Para el análisis de los resultados deben tenerse en cuenta los siguientes parámetros.

- i) El valor medio de los pocillos blanco.
- ii) El valor medio de los pocillos positivos con sus respectivas desviaciones estándar.
- iii) El valor medio de los pocillos negativos con sus respectivas desviaciones estándar.
- iv) El valor medio de los pocillos blanco se resta de la media de todas las demás muestras si no lo ha hecho automáticamente el lector de ELISA.
- v) Los sueros control se titulan de tal forma que den valores de densidad óptica de entre 0,90 y 1,50 en el caso del control positivo, y de entre 0,15 y 0,30 en el caso del control negativo.

Los valores positivos son los que se encuentran por encima del punto de corte calculado, que es la suma de la media del negativo más dos veces la desviación estándar.

Como en todas las pruebas de diagnóstico, es importante medir la repetibilidad. Para más detalles, véase el capítulo 2.2.4 *Incertidumbre de la medición*.

2.3. ELISA sándwich de doble antígeno por desplazamiento para diferenciar entre anticuerpos contra *A. marginale* y anticuerpos contra *A. centrale*

En las regiones en las que se recurre a la vacunación con *A. centrale* para controlar la anaplasmosis bovina, puede ser útil diferenciar entre los animales vacunados con *A. centrale* y los infectados con *A. marginale*. Dado que suele haber una gran identidad de aminoácidos entre las proteínas de superficie de *A. marginale* y *A. centrale*, resulta difícil identificar dianas únicas para ensayos serológicos con este fin. Se utilizaron epítomos de MSP5 (aa28-210, sin la región transmembrana) que no comparten *A. marginale* y *A. centrale* para desarrollar un ELISA de sándwich de doble antígeno desplazado (ddasELISA) (Bellezze et al., 2023; Sarli et al., 2020). Los epítomos recombinantes MSP5 de *A. marginale* o *A. centrale* se expresan en *E. coli* con una etiqueta de histidina y se purifican. A continuación, las placas ELISA se recubren con el epítomo MSP5 recombinante de *A. marginale* o con el epítomo MSP5 de *A. centrale* y se bloquean. Se añade suero a los pocillos y se deja incubar. Tras el lavado, se añade una combinación de proteínas recombinantes biotiniladas y no biotiniladas para mejorar la especificidad de la reacción (véanse los detalles a continuación). La unión proteína-biotina al anticuerpo sérico se detecta con un sistema de detección basado en peroxidasa-estreptavidina. Se mide la densidad óptica para el pocillo recubierto de *A. marginale* MSP5 (ODAm) y la DO para el pocillo recubierto de *A. centrale* MSP5 (ODAc) para cada animal. Si la DO para cualquiera de los objetivos es $<0,2$, la muestra se excluye del análisis. Para las muestras restantes, se calcula la relación entre los valores de DO (ODAm/ODAc). Si la relación es $>0,38$ la muestra se considera positiva para anticuerpos anti-*A. marginal* e, y una relación $\leq 0,38$ se clasifica como vacunada con *A. centrale*.

Para la detección de *A. marginale* la prueba tiene una especificidad diagnóstica del 98% y una sensibilidad diagnóstica del 98,9%. De las 702 muestras de campo evaluadas, 131 (19%) tenían una DO $<0,2$ en el ddasELISA y, por consiguiente, fueron excluidas del análisis. De esos animales, el 52% dieron positivo por PCR anidada para *A. marginale*, el 23% dieron positivo por PCR anidada para *A. centrale*, el 4,6% dieron positivo por PCR anidada para *A. marginale* y *A. centrale*, el 20% dieron negativo por PCR anidada para ambos, lo que sugiere que el ddasELISA puede carecer de sensibilidad.

De las 571 muestras de campo positivas al ddasELISA, la concordancia entre el ddasELISA y la PCR anidada fue del 84% y el coeficiente kappa fue de 0,70 (IC 95%: 0,635-0,754), lo que indica una concordancia sustancial entre las pruebas. Hubo concordancia entre ddasELISA y la PCR anidada en el 93% de las muestras positivas a ddasELISA de *A. marginale* y en el 86% de las muestras positivas a ddasELISA de *A. centrale*. Además, 36 muestras negativas a la PCR anidada dieron positivo a anticuerpos contra *A. marginale* ($n=28$) o *A. centrale* ($n=8$) mediante ddasELISA. Esta prueba no pudo identificar animales con coinfecciones, es decir, animales vacunados con *A. centrale* que luego se infectan con *A. marginale*, lo que no es infrecuente.

Los resultados de la prueba ddasELISA están disponibles en 5-6 horas. Se lleva a cabo como se indica a continuación, ver Bellezze et al., 2023 para más información.

2.3.1. Reactivos de las pruebas

- i) Una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta con proteína recombinante de *A. marginale* o *A. centrale*
- ii) Tampón PBS/Tween (PBS (50 mM de fosfato sódico, 150 mM de NaCl, pH 7,2) con 0,05% de Tween-20)
- iii) Reactivo de bloqueo (PBS con un 10% de leche desnatada en polvo comercial)
- iv) Epítomos MSP5 recombinantes purificados de *A. marginale* y epítomos de *A. centrale*
- v) Epítomos MSP5 recombinantes de *A. marginale* y epítomos de *A. centrale* biotinilados
- vi) Sistema de detección con estreptavidina y peroxidasa de rábano (HRP)
- vii) Sustrato cromogénico (1 mM de sal de 2,2'-azinobis [ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]-diamonio en 0,05 M de citrato de sodio, pH 4,5, 0,0025% V/V de H₂O₂ (100 µl/pocillo).
- viii) Lector de placas ELISA (lectura a 405 nm).
- ix) Sueros de control positivo y negativo para *A. marginale* y *A. centrale*

2.3.2. Procedimiento analítico

- i) Las placas se recubren durante la noche.
- ii) Bloquear con tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y lavar tres veces con tampón PBS/Tween.
- iii) Añadir suero sin diluir 100 µl/pocillo e incubar a 25°C durante 1 hora a 100 rpm.
- iv) Lavar tres veces con tampón PBS/Tween.
- v) Añadir 100 µl de MSP5-biotina de *A. marginale* (1 µg/ml) más MSP5 de *A. centrale* (10 µg/ml) a los pocillos de ensayo de *A. marginale*. Añadir MSP5-biotina de *A. centrale* (1 µg/ml) más MSP5 de *A. marginale* (10 µg/ml) en tampón PBS/Tween + 10% de leche en polvo sin grasa a los pocillos de ensayo de *A. centrale*.
- vi) Incubar a 25°C durante 1 hora a 100 rpm y lavar la placa cinco veces con tampón PBS/Tween.
- vii) Para detectar el complejo proteína-biotina unido, añadir estreptavidina-HRP diluida en 1/500 en tampón PBS/Tween con 10% de leche en polvo durante 1 hora a 25°C, 100 rpm.
- viii) Lavar cinco veces con tampón PBS/Tween.
- ix) Añadir sustrato cromogénico siguiendo las instrucciones del fabricante.
- x) La reacción se mide con un espectrofotómetro lector de microplacas a una longitud de onda de 405 nm. Los datos se expresan en densidad óptica (DO).
- xi) Una DO_{405nm} <0,2 se considera negativa.
- xii) Los resultados se expresan como la relación entre anticuerpos específicos para *A. marginale* MSP5 y para *A. centrale* MSP5 (ODAm/ODAc). Si la relación es >0,38 la muestra se considera positiva para anticuerpos anti-*A. marginale*, y una relación ≤ 0,38 se clasifica como vacunada con *A. centrale*.

2.4. Prueba de aglutinación en placa

La sensibilidad del CAT oscila entre el 84% y el 98% (González et al., 1978; Molloy et al., 1999) y la especificidad es del 98,6% (Molloy et al., 1999). Aunque a veces da resultados variables, el CAT puede ser útil en determinadas circunstancias, ya que puede realizarse en el laboratorio o en el campo, y que proporciona el resultado en unos pocos minutos. Las reacciones inespecíficas pueden ser un problema, y la subjetividad de la interpretación de las reacciones en las pruebas puede tener como consecuencia una variación en su interpretación. Además, el antígeno para la CAT, que es un lisado de *A. marginale* aislado de eritrocitos, puede ser difícil de preparar y puede variar de un lote a otro y de un laboratorio a otro. Para obtener el antígeno, se infectan terneros esplenectomizados mediante la inoculación intravenosa con sangre que contenga eritrocitos infectados por *A. marginale*. Cuando la

rickettsiemia supera el 50%, el animal se sangra, los eritrocitos infectados se lavan y se lisan, y las membranas de los eritrocitos y *A. marginale* se centrifugan. Los sedimentos se sonicán, se lavan, y luego se resuspenden en una solución de colorante para producir la solución de antígeno.

Un procedimiento con ligeras modificaciones respecto al descrito originalmente (Amerault & Roby, 1968; Amerault *et al.*, 1972) es el siguiente, y se basa en condiciones controladas en un contexto de laboratorio:

2.4.1. Procedimiento analítico

- i) Se comprueba, antes de su uso, que todos los componentes de la prueba están a una temperatura de 25–26°C (esta temperatura constante es un factor crítico en la prueba).
- ii) En cada círculo de la placa de la prueba (un perspex/plástico transparente o una placa de cristal con círculos marcados de 18 mm de diámetro), se colocan uno al lado de otro, pero sin tocarse, 10 µl de factor de suero bovino (BSF), 10 µl del suero problema, y 5 µl del antígeno CAT¹. En cada placa se deben analizar sueros control negativos y débilmente positivos.

El BSF es el suero de un animal seleccionado con un alto nivel de congulutina. Si se desconoce el nivel de congulutinas, se puede utilizar suero fresco de un animal que esté libre de *Anaplasma*. El BSF se debe guardar a –70°C en pequeñas alícuotas y, cada vez que se realizan las pruebas, se utiliza una alícuota fresca. La inclusión del BSF mejora la sensibilidad de la prueba.

- iii) Se mezcla bien con una varilla de vidrio. Después de mezclar cada prueba, se limpia la varilla de vidrio con un papel limpio para evitar la contaminación cruzada.
- iv) Se coloca la placa de prueba en una cámara húmeda y se agita a 100–110 rpm durante 7 minutos.
- v) Se lee inmediatamente a contraluz. Una aglutinación característica del antígeno (valorada de +1 a +3) se considera un resultado positivo. Se considera que la prueba da un resultado negativo cuando no existe esa aglutinación característica.

Se ha validado parcialmente una prueba de aglutinación en tarjeta de látex, una plataforma de prueba relativamente sencilla y rápida. Esta prueba utiliza rMSP5-HIS en lugar de lisado de *A. marginale* y no requiere BSF. El rendimiento de esta prueba se comparó con el de la prueba I-ELISA utilizando rMSP5-HIS como antígeno. La sensibilidad relativa fue del 95,2% y la especificidad relativa del (Ramos *et al.*, 2014).

2.5. Prueba de inmunofluorescencia indirecta

Debido a la escasez de pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFA) que puede realizar diariamente un operario, se suelen preferir otras pruebas serológicas. La IFA se realiza como se describe para la babesiosis bovina en el capítulo 3.4.2, excepto por el hecho de que para la preparación de frotis de antígeno se utiliza sangre infectada por *A. marginale*. Un problema serio de esta prueba es la fluorescencia inespecífica. La sensibilidad reportada es del 97,6% y la especificidad, del 89,6% (Gonzalez *et al.*, 1978). Es muy probable que el antígeno obtenido de la sangre recogida tan pronto como aparezca una rickettsiemia suficiente (5–10%) resulte idóneo. La fluorescencia inespecífica debida a anticuerpos que se adhieren a los eritrocitos infectados puede reducirse lavando los eritrocitos en un tampón ácido de glicina antes de preparar los frotis de antígeno. Los eritrocitos infectados se lavan dos veces en tampón de glicina 0,1 M (pH 3,0, centrifugado a 1.000 g durante 15 minutos a 4°C) y luego una vez en PBS, pH 7,4. Datos publicados recientemente muestran que la IFA, como el C-ELISA, pueden presentar reacción cruzada con otros miembros de la familia Anaplasmataceae y específicamente una especie de *Ehrlichia* spp. Identificada como BOV2010 (Al-Adhami *et al.*, 2011).

1 En EE.UU. y México, la prueba se realiza con volúmenes mayores de reactivos: antígeno (15 µl), suero (30 µl), y factor de suero bovino (30 µl) en un tiempo de reacción de 4 minutos (ver paso iv).

2.6. Prueba de fijación del complemento

La prueba de fijación del complemento (CF) se utilizó ampliamente durante muchos años; sin embargo, tiene una sensibilidad variable (que oscila entre el 20 y el 60%), posiblemente como reflejo de las diferencias en las técnicas de producción del antígeno, y una escasa reproducibilidad. Además, la CF no detecta una proporción significativa de bovinos portadores (Bradway *et al.*, 2001). Tampoco se sabe con certeza si la CF puede identificar anticuerpos en animales infectados agudamente antes que otros ensayos (Coetzee *et al.*, 2007; Molloy *et al.*, 1999). Por consiguiente, la CF ya no se recomienda como ensayo fiable para detectar animales infectados.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

Se han utilizado varios procedimientos de inmunización para proteger al ganado bovino contra la anaplasmosis en los países donde la enfermedad es endémica, pero hasta la fecha ninguno es ideal. Se ha publicado una revisión de las vacunas contra *E. marginale* y sus antígenos (Kocan *et al.*, 2010; Noh *et al.*, 2012). El uso de la especie menos patógena, *A. centrale*, que proporciona una protección parcial cruzada frente a *A. marginale*, es el método más ampliamente aceptado, aunque en muchos países, incluida Norteamérica, no se utiliza.

En este apartado, se describe la producción de vacuna viva contra *A. centrale*. Consiste en la infección de un ternero esplenectomizado susceptible y el uso de su sangre como vacuna. Existen descripciones detalladas del procedimiento de producción y se deben consultar estas publicaciones para conocer los detalles de los procedimientos que se resumen aquí (Bock *et al.*, 2004; de Vos & Jorgensen, 1992; Pipano, 1995).

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se presentan en el capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices dadas aquí y en el capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden completarse con requisitos nacionales y regionales.

La vacuna contra *Anaplasma centrale* puede suministrarse en forma congelada o refrigerada dependiendo de la demanda, las redes de transporte y la disponibilidad de nitrógeno líquido o de hielo seco. En la mayor parte de los casos, se recomienda la vacuna congelada, ya que permite un control de calidad de cada lote después de la producción. Sin embargo, es más cara de producir y más difícil de transportar que la vacuna refrigerada. El riesgo de contaminación hace que el control después de la producción sea esencial, pero puede ser prohibitivamente caro.

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

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

Anaplasma centrale se aisló por primera vez en 1911 en Sudáfrica y se ha utilizado como vacuna en Sudamérica, Australia, África, Oriente Medio, y Sudeste Asiático. Solo confiere una protección parcial, pero suficiente, en regiones donde las cepas circulantes que provocan la enfermedad son de una virulencia moderada (como Australia) (Bock & de Vos, 2001). En los trópicos húmedos, donde *A. marginale* puede ser más virulento, la protección conferida por *A. centrale* puede ser insuficiente para evitar la enfermedad en algunos animales.

Normalmente, *Anaplasma centrale* causa infecciones benignas, especialmente si se emplea en terneros menores de 9 meses de edad. Se han descrito reacciones graves después de la vacunación cuando se inocula el ganado adulto. La idoneidad de una cepa de *A. centrale* como vacuna puede determinarse inoculando ganado vacuno susceptible, realizando un seguimiento de las reacciones siguientes, y exponiendo después a los animales y a controles susceptibles a una cepa local virulenta de *A. marginale*. Se puede evaluar tanto la inocuidad como la eficacia con un seguimiento de las rickettsiemias en frotis de sangre teñidos y según la disminución del hematocrito, durante la vacunación y los periodos de reacción al desafío, en el ganado vacuno inoculado.

El material infectivo para preparar la vacuna se almacena fácilmente en forma de estabilizados congelados de sangre infectada en nitrógeno líquido o hielo seco. Los crioprotectores recomendados son el dimetilsulfóxido (DMSO) o la polivinilpirrolidona M.W. 40.000 (Bock *et al.*, 2004), puesto que permiten la administración intravenosa tras la descongelación del estabilizado. En otro artículo se detalla la técnica de congelación en la que se emplea DMSO (Mellors *et al.*, 1982), pero en resumen consiste en lo siguiente: se extrae sangre infectada, se refrigera a 4°C y se le añade crioprotector refrigerado (DMSO 4M en PBS) lentamente con agitación hasta que se consigue una proporción final de sangre:protector de 1:1, para lograr una concentración final de DMSO 2M. Todo el procedimiento de dilución se lleva a cabo en un baño de hielo y la sangre diluida se distribuye en recipientes adecuados (por ejemplo, crioviales de 5 ml), y se congela, cuanto antes, en la fase de vapor de un recipiente de nitrógeno líquido.

2.1.2. Criterios de calidad

La pureza de la cepa de *A. centrale* se puede determinar mediante pruebas serológicas de sueros pareados tomados de ganado vacuno en la prueba de inocuidad para comprobar la presencia de posibles agentes patógenos contaminantes (Bock *et al.*, 2004; Pipano, 1997). En los terneros donantes empleados para propagar el inóculo para la producción de vacuna deben comprobarse todas las infecciones sanguíneas prevalentes en el país productor de la vacuna, como *Babesia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Theileria* y *Trypanosoma*. Esto se puede hacer mediante examen rutinario de extensiones de sangre teñidas obtenidas de animales esplenectomizados, PCR y preferiblemente también mediante serología. Todos los terneros que presenten signos de infección natural por cualquiera de los microorganismos mencionados, debe ser rechazado. La ausencia de otros agentes infecciosos también debe confirmarse. Entre ellos, los causantes de la leucosis enzoótica bovina, la enfermedad de las mucosas, la rinotraqueítis bovina infecciosa, la fiebre efímera, la enfermedad de Akabane, la lengua azul, y la glosopeda o fiebre aftosa. Las pruebas dependerán de las enfermedades prevalentes en el país en cuestión y de la disponibilidad de pruebas, pero como mínimo deben incluir serología de sueros pareados y, en ciertos casos, el aislamiento del virus y la detección del antígeno o del ADN/ARN (Bock *et al.*, 2004; Pipano, 1981; 1997).

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

i) Producción de vacuna congelada

Se descongelan las cantidades del estabilizado congelado (5–10 ml) por inmersión de los viales en agua precalentada a 40°C. El material descongelado se mantiene en hielo y se usa lo antes posible (en 30 minutos) para infectar un ternero susceptible esplenectomizado por inoculación intravenosa.

La rickettsiemia de este ternero donante se analiza diariamente examinando extensiones de sangre teñida de la yugular, y se recoge la sangre para producción de la vacuna cuando se alcanza una rickettsiemia suficiente. El mínimo requerido para la producción de la vacuna es una rickettsiemia de 1×10^8 /ml (aproximadamente 2% de rickettsiemia en la sangre de la yugular), porque esta es la dosis necesaria para vacunar a una res. Si no se obtiene una rickettsiemia adecuada, puede ser necesario realizar un pase de la cepa mediante la subinoculación de 100–200 ml de sangre a un segundo ternero esplenectomizado.

La sangre del donante se recoge mediante la canulación aséptica de la yugular o la carótida, utilizando heparina como anticoagulante (5 Unidades Internacionales [UI] de heparina/ml de sangre). El uso de unidades de sangre para uso humano también es adecuado y garantiza la esterilidad, además de evitar la preparación de frascos de vidrio, que hacen el procedimiento más engorroso.

En el laboratorio, la sangre infectiva se mezcla a 37°C con volúmenes iguales de glicerol 3M en PBS, suplementado con glucosa 5 mM (concentración final de glicerol 1,5 M). La mezcla se equilibra a 37°C durante 30 minutos y se distribuye en recipientes adecuados (por ejemplo, en crioviales de 5 ml). Los viales se enfrían en la fase de vapor de nitrógeno

líquido a una velocidad aproximada de 10°C/minuto y, cuando están congelados, se guardan en la fase líquida (Bock *et al.*, 2004).

En lugar de glicerol se puede utilizar DMSO como crioprotector. En este caso se lleva a cabo del mismo modo que para la preparación del estabilizado (Mellors *et al.*, 1982; Pipano, 1981).

Si se tiene que diluir la vacuna preparada en glicerol, el diluyente debe ser PBS con glicerol 1,5 M y glucosa 5 mM (Jorgensen *et al.*, 1989). Las vacunas crioconservadas con DMSO deben diluirse con un diluyente que contenga la misma concentración de DMSO que la sangre original crioconservada (Pipano *et al.*, 1986).

ii) Producción de vacuna refrigerada

El material infeccioso para las vacunas refrigeradas se preparara como para las vacunas congeladas, pero debe ser procesado y utilizado lo antes posible después de su recogida. La sangre infecciosa se puede diluir para lograr 1×10^7 parásitos por dosis de vacuna. Un diluyente adecuado es el suero bovino estéril al 10% en una solución de glucosa/solución salina equilibrada que contenga las siguientes cantidades por litro: NaCl (7,00 g), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,34 g), glucosa (1,00 g), Na_2HPO_4 (2,52 g), KH_2PO_4 (0,90 g), y $NaHCO_3$ (0,52 g).

Si no se dispone de diluyente, se debe utilizar como anticoagulante dextrosa citrato ácido (20% [v/v]) o dextrosa citrato fosfato (20% [v/v]) para suministrar la glucosa necesaria para la supervivencia de los microorganismos.

iii) Uso de la vacuna

En el caso de las vacunas congeladas, los viales se descongelan por inmersión en agua precalentada a entre 37°C - 40°C, y el contenido se mezcla con un diluyente adecuado hasta la dilución requerida. Si se preparan las vacunas con glicerol, deben mantenerse refrigeradas y utilizarse en un plazo de 8 horas tras la preparación (Bock *et al.*, 2004). Si se utiliza DMSO como crioprotector, las vacunas preparadas deben mantenerse en hielo y utilizarse en un plazo de 15–30 minutos (Pipano, 1981). El modo más común de administración de la vacuna es por vía subcutánea.

iv) Las vacunas refrigeradas se deben mantener en frío y utilizarse dentro de los 4–7 días siguientes a su preparación.

La cepa de *A. centrale* que se usa en las vacunas es baja virulencia, pero no es del todo segura. En consecuencia, un consejo práctico es que se limite el uso de las vacunas a los terneros, en los que la inmunidad inespecífica reducirá el riesgo de reacciones debidas a la vacunación. Cuando se tienen que vacunar animales de mayor edad, existe el riesgo de reacciones graves. Estas reacciones no son frecuentes, pero la presencia de animales reproductores de alto valor o en gestantes merece especial atención, y deben observarse a diario durante 3 semanas después de la vacunación. Los animales clínicamente enfermos deben tratarse con oxitetraciclina o imidocarb a las dosis recomendadas por los fabricantes. La inmunidad protectora se desarrolla en 6–8 semanas y por lo general persiste varios años.

A menudo se utilizan en paralelo las vacunas contra la anaplasmosis y la babesiosis, pero no es recomendable utilizar simultáneamente otras vacunas (Bock *et al.*, 2004).

2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

Anaplasma centrale se puede cultivar en líneas celulares de *Rhipicephalus appendiculatus* y *Dermacentor variabilis*, aunque es necesario comprobar la expresión de antígenos y la inmunogenicidad del *A. centrale* cultivado (Bell-Sakyi *et al.*, 2015). En la producción de vacuna no se emplea ningún sustrato ni medio aparte de tampones y diluyentes. En cuanto al DMSO o el glicerol, deben adquirirse en empresas cuya calidad se conozca.

2.2.3. Controles durante el proceso

i) Origen y mantenimiento de los donantes de vacuna

Debe identificarse un grupo de terneros exentos de infección natural por *A. marginale* y de otras enfermedades transmitidas por las garrapatas. Si no se dispone de ellos, puede ser necesario criar los terneros en condiciones de ausencia de garrapatas con el propósito específico de la producción de vacunas.

Los terneros deben mantenerse en condiciones tales que se evite su exposición a las enfermedades infecciosas y a las garrapatas y a los insectos picadores. En ausencia de instalaciones adecuadas, debe valorarse el riesgo de contaminación con los agentes causales de enfermedades infecciosas que estén presentes en el país concreto, y se deben comparar los beneficios derivados de la producción local de vacunas frente a las posibles consecuencias adversas de difundir enfermedades (Bock et al., 2004).

ii) Cirugía

Deben someterse a esplenectomía los terneros donantes para maximizar la multiplicación de microorganismos para la producción de vacuna. Lo mejor es hacerlo en terneros jóvenes y con anestesia general.

iii) Pruebas de detección de enfermedades en los donantes de vacuna antes de la inoculación

Como ocurre para la preparación de estabilizado de inóculo, en los terneros donantes para la producción de vacuna debe comprobarse si presentan infección por cada una de las infecciones transmitidas por la sangre prevalentes en el país productor de la vacuna, incluyendo *Babesia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Theileria* y *Trypanosoma*. Esto se lleva a cabo mediante el examen rutinario de extensiones de sangre teñidas después de la esplenectomía, y preferiblemente también mediante serología. Cualquier ternero que muestre signos de infecciones naturales por cualquiera de estos microorganismos debe ser rechazado. También debe confirmarse la ausencia de otros agentes infecciosos, como los de la leucosis enzoótica bovina, la diarrea vírica bovina, la rinotraqueítis bovina infecciosa, la fiebre efímera, la enfermedad de Akabane, la lengua azul o la fiebre aftosa. Las pruebas dependerán de las enfermedades prevalentes en el país y de la disponibilidad de las pruebas, pero como mínimo deben incluir la serología de sueros pareados y, en algunos casos, el aislamiento del agente, y la detección del antígeno o del ADN/ARN (Bock et al., 2004; Pipano, 1981; 1997).

iv) Seguimiento de las rickettsiemias tras la inoculación

Es necesario determinar la concentración de rickettsias en la sangre recogida para las vacunas. La concentración de rickettsias se puede estimar a partir del recuento de eritrocitos y de la rickettsiemia (porcentaje de eritrocitos infectados).

v) Extracción de sangre para la vacuna

Todo el equipo ha de esterilizarse antes de usarlo (por ejemplo, en autoclave). Una vez alcanzada la rickettsiemia deseada, la sangre se recoge con heparina utilizando técnicas estrictamente asépticas. Esto se realiza más fácilmente si se seda al ternero y se usa un circuito cerrado de recolección.

Se pueden extraer hasta 3 litros de sangre con niveles de infección elevados de un ternero de 6 meses. Si el ternero va a permanecer vivo, es adecuada la transfusión de una cantidad similar de sangre de un donante apropiado. Alternativamente, el ternero debe ser sacrificado inmediatamente después de la extracción de la sangre.

vi) Distribución de la vacuna

Todos los procedimientos se realizan en un ambiente apropiado, como en una cabina de flujo laminar, utilizando técnicas estériles estándar. El uso de un agitador mecánico o magnético asegura una buena mezcla de la sangre y del diluyente a lo largo de todo el

proceso de distribución. En el momento de la distribución se añaden a la vacuna penicilina (500.000 IU/litro) y estreptomycin (370.000 µg/litro).

2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

En el caso de las vacunas refrigeradas, no se puede determinar la potencia, la inocuidad y la esterilidad de los lotes de vacuna y, en el caso de las vacunas congeladas, las especificaciones dependen del país concreto. Las siguientes indicaciones se aplican a las vacunas congeladas producidas en Australia.

i) Esterilidad y pureza

Se utilizan técnicas estándar de esterilidad para cada lote de vacuna y diluyente (véase el capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario*).

La ausencia de contaminantes se determina mediante pruebas serológicas adecuadas en el ganado vacuno donante, inoculando linfocitos de los donantes en ovejas y realizando después un seguimiento de las mismas para comprobar si presentan infección vírica, e inoculando el ganado vacuno y realizando un seguimiento serológico del mismo para determinar si están infectados por agentes que puedan contaminar la vacuna. El ganado vacuno inoculado durante la prueba de potencia (véase el apartado C.2.2.4.iii) es adecuado para este fin. Dependiendo del país de origen de la vacuna, estos agentes incluyen los microorganismos que causan la leucosis enzoótica bovina, la rinotraqueítis bovina infecciosa, la diarrea vírica bovina, la fiebre efímera, la enfermedad de Akabane, el virus Aino, la lengua azul, la parainfluenza, la fiebre aftosa, la dermatosis nodular contagiosa, la rabia, la fiebre del Valle del Rift, la pleuroneumonía bovina contagiosa, la enfermedad de Jembrana, la cowdriosis, las especies patógenas de *Theileria* y *Tripanosoma* spp., *Brucella abortus*, *Coxiella* y *Leptospira* (Bock *et al.*, 2004; Pipano, 1981; 1997). Otros agentes patógenos a tener en cuenta son los agentes causales de la tuberculosis bovina y de la brucelosis, porque pueden propagarse en la sangre contaminada que se utiliza para la producción de la vacuna. La mayor parte de estos agentes pueden detectarse mediante PCR específicas, y en muchas publicaciones se describen los cebadores y las condiciones analíticas específicas para cada enfermedad.

ii) Inocuidad

Se realiza un seguimiento de las reacciones vacunales del ganado bovino inoculado en la prueba de potencia (véase Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de las vacunas veterinarias*) mediante la medición de la rickettsiemia y del descenso del hematocrito. Solo se ponen en circulación para su uso los lotes con niveles de patogenicidad iguales o inferiores a un estándar predeterminado.

iii) Potencia

La vacuna se descongela y se diluye a 1/5 con un diluyente adecuado (Bock *et al.*, 2004). Una vez diluida, se incuba luego 8 horas a 4°C, y se inoculan subcutáneamente cinco cabezas de ganado con dosis de 2 ml. Se comprueba si los animales inoculados presentan infecciones examinando frotis de sangre teñidos. Para que un lote sea aceptable, todos deben estar infectados. Un lote que resulte infeccioso se recomienda para el uso a una dilución 1/5 con diluyente isotónico.

2.3. Requisitos para la autorización

2.3.1. Inocuidad

La cepa de *A. centrale* que se emplea en la vacuna es de baja virulencia, pero no del todo inocua. Por tanto, en la práctica se recomienda restringir el uso de la vacuna a los terneros, pues la inmunidad inespecífica reducirá el riesgo de reacciones vacunales. Cuando hay que vacunar a animales de más edad, existe riesgo de reacciones graves. Estas reacciones son infrecuentes, pero si se trata de reproductores de alto valor o animales gestantes, es necesario prestar mucha atención, observándolos a diario durante las 3 semanas siguientes a la vacunación. Los

animales clínicamente enfermos deben tratarse con oxitetraciclina o imidocarb a las dosis recomendadas por los fabricantes.

Anaplasma centrale no es tan infectiva como otras especies, y la vacuna no se considera que tenga otros efectos ambientales adversos. La vacuna no es infectiva en el ser humano. Cuando el producto se almacena en nitrógeno líquido, son aplicables las precauciones habituales relativas al almacenaje, transporte y manipulación de material congelado a muy bajas temperaturas.

2.3.2. Requisitos de eficacia

La inmunización con *A. centrale* vivo produce una infección a largo plazo del animal vacunado, por lo que no es necesario repetir la vacunación. La infección por *A. centrale* no previene la infección posterior por *A. marginale*, pero al menos protege de la enfermedad (Shkap et al., 2009). La vacuna se usa para el control de la anaplasmosis clínica en áreas endémicas. No proporcionará inmunidad estéril, y no debe emplearse para la erradicación de *A. marginale*.

2.3.3. Estabilidad

Cuando se almacena en nitrógeno líquido, la vacuna se puede mantener durante 5 años. Una vez que se descongela, pierde rápidamente su potencia. La vacuna descongelada no puede congelarse de nuevo.

3. Vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética

No existen vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética para la anaplasmosis.

BIBLIOGRAFÍA

AL-ADHAMI B., SCANDRETT W.B., LOVANO V.A. & GAJADHAR A.A. (2011). Serological cross reactivity between *Anaplasma marginale* and *Ehrlichia* species in naturally and experimentally infected cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 23, 1181–1188.

AMEREAULT T.E. & ROBY T.O. (1968). A rapid card agglutination test for bovine anaplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 153, 1828–1834.

AMEREAULT T.E., ROSE J.E. & ROBY T.O. (1972). Modified card agglutination test for bovine anaplasmosis: evaluation with serum and plasma from experimental and natural cases of anaplasmosis. *Proc. U.S. Anim. Health Assoc.*, 76, 736–744.

BARRY D.N., PARKER R.J., DE VOS A.J., DUNSTER P. & RODWELL B.J. (1986). A microplate enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibody to *Anaplasma marginale* in cattle serum. *Aust. Vet. J.*, 63, 76–79.

BELL-SAKYI L., PALOMAR A.M., BRADFORD E.L. & SHKAP V. (2015). Propagation of the Israeli vaccine strain of *Anaplasma centrale* in tick cell lines. *Vet. Microbiol.*, 179, 270–276.

BELLEZZE J., THOMPSON C.S., BOSIO A.S., TORIONI S.M. & PRIMO M.E. (2023). Development and field evaluation of an ELISA to differentiate *Anaplasma marginale*-infected from *A. centrale*-vaccinated cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 35, 204–208.

BOCK R., JACKSON L., DE VOS A. & JORGENSEN W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129, Suppl, S247–269.

BOCK R.E. & DE VOS A.J. (2001). Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust. Vet. J.*, 79, 832–839.

BRADWAY D.S., TORIONI DE ECHAIDE S., KNOWLES D.P., HENNAGER S.G. & McELWAIN T.F. (2001). Sensitivity and specificity of the complement fixation test for detection of cattle persistently infected with *Anaplasma marginale*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 13, 79–81.

- CARELLI G., DECARO N., LORUSSO A., ELIA G., LORUSSO E., MARI V., CECI L. & BUONAVOGLIA C. (2007). Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Vet. Microbiol.*, 124, 107–114.
- COETZEE J.F., SCHMIDT P.L., APLEY M.D., REINBOLD J.B. & KOCAN K.M. (2007). Comparison of the complement fixation test and competitive ELISA for serodiagnosis of *Anaplasma marginale* infection in experimentally infected steers. *Am. J. Vet. Res.*, 68, 872–878.
- CHUNG C., WILSON C., BANDARANAYAKA-MUDIYANSELAGE C.-B., KANG E., ADAMS D.S., KAPPMAYER L.S., KNOWLES D.P., McELWAIN T.F., EVERMANN J.F., UETI M.W., SCOLES G.A., LEE S.S. & MCGUIRE T.C. (2014). Improved diagnostic performance of a commercial *Anaplasma* antibody competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5-glutathione S-transferase fusion protein as antigen. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 26, 61–71.
- DECARO N., CARELLI G., LORUSSO E., LUCENTE M.S., GRECO G., LORUSSO A., RADOGNA A., CECI L. & BUONAVOGLIA C. (2008). Duplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection and quantification of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20, 606–611.
- DE VOS A.J. & JORGENSEN W.K. (1992). Protection of cattle against babesiosis in tropical and subtropical countries with a live, frozen vaccine. In: Tick Vector Biology, Medical and Veterinary Aspects, Fivaz B.H., Petney T.N. & Horak I.G., eds. Springer Verlag, Berlin, Germany, 159–174.
- DREHER U.M., DE LA FUENTE J., HOFMANN-LEHMANN R., MELI M.K., PUSTERIA N., KOCAN K.M., WOLDEHIWET A., REGULA G. & STAERK K.D.C. (2005). Serologic cross reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin. Vaccine. Immunol.*, 12, 1177–1183.
- DUMLER J.S., BARBET A.F., BEKKER C.P., DASCH G.A., PALMER G.H., RAY S.C., RIKIHISA Y. & RURANGIRWA F.R. (2001). Reorganization of genera in the Families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia*, and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of five new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HGE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 2145–2165.
- FUTSE J.E., UETI M.W., KNOWLES D.P. JR. & PALMER G.H. (2003). Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: retention of vector competence in the absence of vector-pathogen interaction. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 3829–3834.
- GONZALEZ, E. F., LONG R. F. & TODOROVIC R. A. (1978). Comparisons of the complement-fixation, indirect fluorescent antibody, and card agglutination tests for the diagnosis of bovine anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.*, 39, 1538-1541.
- HOFMANN-LEHMANN R., MELI M.L., DREHER U.M., GÖNCZI E., DEPLAZES P., BRAUN U., ENGELS M., SCHÜPBACH J., JÖRGER K., THOMA R., GRIOT C., STÄRK K.D.C., WILLI B., SCHMIDT J., KOCAN K.M. & LUTZ H. (2004). Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal haemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 3775–3780.
- JORGENSEN W.K., DE VOS A.J. & DALGLIESH R.J. (1989). Infectivity of cryopreserved *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma centrale* for cattle after thawing, dilution and incubation at 30°C. *Vet. Parasitol.*, 31, 243–251.
- KOCAN K. M., J. DE LA FUENTE, BLOUIN E. F., COETZEE J. F. & EWING S. A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.*, 167, 95–107.
- KNOWLES D., TORIONI DE ECHAIDE S., PALMER G., MCGUIRE T., STILLER D. & McELWAIN T. (1996). Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 2225–2230.
- MATEI I.A., ESTRADA-PENA A., CUTLER S.J., VAYSSIER-TAUSSAT M., VARELA-CASTRO L., POTKONJAK A., ZELLER H. & MIHALCA A.D. (2019). A review on the eco-epidemiology and clinical management of human granulocytic anaplasmosis and its agent in Europe. *Parasit. Vectors*, 12, 599.

- MELLORS L.T., DALGLIESH R.J., TIMMS P., RODWELL B.J. & CALLOW L.L. (1982). Preparation and laboratory testing of a frozen vaccine containing *Babesia bovis*, *Babesi abigemina* and *Anaplasma centrale*. *Res. Vet. Sci.*, 32, 194–197.
- MOLLOY J.B., BOWLES P.M., KNOWLES D.P., McELWAIN T.F., BOCK R.E., KINGSTON T.G., BLIGHT G.W. & DALGLIESH R.J. (1999). Comparison of a competitive inhibition ELISA and the card agglutination test for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in cattle. *Aust. Vet. J.*, 77, 245–249.
- NIELSEN K., SMITH P., GALL D., DE ESHAIDE S. T., WAGNER G. & DAJER A. (1996). Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Anaplasma marginale* in bovine sera. *Vet. Parasitol.*, 67, 133–142.
- NOH S. M. & BROWN W.C. (2012). Adaptive immune responses to infection and opportunities for vaccine development (Anaplasmataceae). *Intracellular Pathogens II: Rickettsiales*. G. H. Palmer. Washington, DC, USA, ASM Press. II: 330–365.
- PIPANO E. (1981). Frozen vaccine against tick fevers of cattle. *In: XI International Congress on Diseases of Cattle*, Haifa, Israel. Mayer E., ed. Bregman Press, Haifa, Israel, 678–681.
- PIPANO E. (1995). Live vaccines against hemoparasitic diseases in livestock. *Vet. Parasitol.*, 57, 213–231.
- PIPANO E. (1997). Vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with special reference to quality assurance. *Trop. Anim. Health Prod.*, 29 (Suppl. 4), 86S–90S.
- PIPANO E., KRIGEL Y., FRANK M., MARKOVICS A. & MAYER E. (1986). Frozen *Anaplasma centrale* vaccine against anaplasmosis in cattle. *Br. Vet. J.*, 142, 553–556.
- RAMOS C.A., ARAUJO F.R., SANTOS R.C., MELO E.S., SOUSA L.C., VIDAL C.E., GUERRA N.R. & RAMOS R.A. (2014). Development and assessment of a latex agglutination test based on recombinant MSP5 to detect antibodies against *Anaplasma marginale* in cattle. *Braz. J. Microbiol.*, 45, 199–204.
- REINBOLD J.B., COETZEE J.F., HOLLIS L.C., NICKELL J.S., RIEGEL C.M., CHRISTOPHER J.A. & GANTA R.R. (2010a). Comparison of iatrogenic transmission of *Anaplasma marginale* in Holstein steers via needle and needle-free injection techniques. *Am. J. Vet. Res.*, 71, 1178–1188.
- REINBOLD J.B., COETZEE J.F., SIRIGIREDDY K.R. & GANTA R.R. (2010b). Detection of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in bovine peripheral blood samples by duplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 48, 2424–2432.
- SARLI M., THOMPSON C.S., NOVOA M., VALENTINI B.S., MASTROPAOLO M., ECHAIDE I.E., DE ECHAIDE S. T. & PRIMO M.E. (2020). Development and evaluation of a double-antigen sandwich ELISA to identify *Anaplasma marginale*-infected and *A. centrale*-vaccinated cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 32, 70–76.
- SHKAP V., KOCAN K., MOLAD T., MAZUZ M., LEBOVICH B., KRIGEL Y., MICHAYTCHENKO A., BLOUIN E., DE LA FUENTE J., SAMISH M., MTSHALI M., ZWEYGARTH E., FLEIDEROVICH E. L. & FISH L. (2009). Experimental transmission of field *Anaplasma marginale* and the *A. centrale* vaccine strain by *Hyalomma excavatum*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* ticks. *Vet. Microbiol.*, 134, 254–260.
- SILAGHI C., NIEDER M., SAUTER-LOUIS C., KNUBBEN-SCHWEIZER G., PFISTER K. & PFEFFER M. (2018). Epidemiology, genetic variants and clinical course of natural infections with *Anaplasma phagocytophilum* in a dairy cattle herd. *Parasit. Vectors*, 11, 20.
- SILVA V.M., ARAUJO F.R., MADRUGA C.R., SOARES C.O., KESSLER R.H., ALMEIDA M.A., FRAGOSO S.P., SANTOS L.R., RAMOS C.A., BACANELLI G. & TORRES R.A. (2006). Comparison between indirect enzyme-linked immunosorbent assays for *Anaplasma marginale* antibodies with recombinant Major Surface Protein 5 and initial body antigens. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 101, 511–516.
- STRIK N.I., ALLEMAN A.R., BARBET A.F., SORENSON H.L., WAMSLEY H.L., GASCHEN F.P., LUCKSCHANDER N., WONG S., CHU F., FOLEY J.E., BJOERSDORFF A., STUEN S. & KNOWLES D.P. (2007). Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* major surface protein 5 and the extent of its cross-reactivity with *A. marginale*. *Clin. Vaccine Immunol.*, 14, 262–268.

TORIONI DE ECHAIDE S., KNOWLES D.P., MCGUIRE T.C., PALMER G.H., SUAREZ C.E. & MCELWAIN T.F. (1998). Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 777–782.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OMSA para la anaplasmosis bovina
(puede consultarse la página web de la OMSA:

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

Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OMSA para cualquier otro dato sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la anaplasmosis bovina.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2024.

Apéndice 1: Anaplasmosis bovina
Finalidad prevista de la prueba: ausencia de infección en la población

Prueba con puntuación y especies	Tipo de muestra y analitos diana	Exactitud	Población problema	Informe de validación	Ventajas	Inconvenientes	Referencias
C-ELISA +++ Bovino	Suero rMSP5-GST	Las pruebas de referencia fueron IFAT y PCR anidada. Dsp = 99,7% Dse = 100% 30% de inhibición determinada mediante análisis ROC	1. 358 bovinos no infectados de rebaños lecheros mantenidos en establos libres de garrapatas y sin antecedentes clínicos de anaplasmosis clínica 2. 135 sueros que se sabía que eran positivos definidos por PCR anidada. 3. Comparación intraprueba con 163 muestras de diagnóstico con posibles falsos positivos basados en C-ELISA rMSP5-GST. Confirmación positiva de la prueba realizada con IFAT	Véase la referencia	1. Versión actualizada con mayor especificidad 2. Alta sensibilidad, detecta animales persistentemente infectados 3. Disponible en el mercado 4. Utiliza un antígeno estandarizado 5. El antígeno diana está muy conservado entre las cepas de <i>A. marginale</i> , por lo que detecta la infección por todas las cepas de <i>A. marginale</i> . 6. Rápido	1. No diferencia entre infección por <i>A. marginale</i> y <i>A. centrale</i> 2. Puede presentar reacción cruzada con anticuerpos anti- <i>Ehrlichia</i> . 3. Puede no estar fácilmente disponible en todos los países. 4. Requiere un lector de absorbancia de microplacas. 5. Bajo porcentaje de falsos positivo.	Chung <i>et al.</i> , 2014
IFAT+ Bovine	Suero Portas con eritrocitos infectados por <i>A. marginale</i>	La prueba de referencia fue el frotis sanguíneo DSe 97.6% Dsp 89.6%	48 bovinos criados en región libre de anaplasmosis 82 animales procedentes de una región endémica	Véase la referencia	1. El antígeno es relativamente fácil de producir y conservar. 2. No requiere muchos reactivos.	1. Baja especificidad. 2. Requiere mucho tiempo y mano de obra, por lo que no es adecuado para un alto rendimiento. 3. Requiere microscopio fluorescente y frotis de sangre con alta rickettsiemia.	Gonzalez <i>et al.</i> , 1978

Apéndice 2: Anaplasmosis bovina

Finalidad prevista de la prueba: Demostrar la ausencia en animales específicos de infección antes de los desplazamientos

Prueba con puntuación y especies	Tipo de muestra y analitos diana	Exactitud	Población problema	Informe de validación	Ventajas	Inconvenientes	Referencias
PCR ++	Sangre entera. Diversas dianas génicas.	Se ha publicado una validación parcial.	51 bovinos de 18 rebaños de tres regiones del sur de Italia fueron sometidos a pruebas de detección de <i>A. marginale</i> , <i>A. centrale</i> , <i>A. bovis</i> , <i>T. buffeli</i> , <i>B. bovis</i> , <i>A. phagocytophilum</i> y <i>B. bigemina</i> . Todos los bovinos, excepto 4, resultaron positivos para al menos uno de estos agentes patógenos.	Véase la referencia.	Buena concordancia notificada entre la PCR anidada y la PCR en tiempo real. Alta sensibilidad analítica (10 ¹ copias de ADN).	Debe realizarse en un laboratorio equipado para extraer ADN y disponer de termocicladores para PCR en tiempo real. Aunque no se ha determinado empíricamente, es probable que la PCR tenga menos sensibilidad que C-ELISA en la detección de bovinos persistentemente infectados.	Carelli et al., 2007.
C-ELISA +++ Bovino	Suero rMSP5-GST	Las pruebas de referencia fueron la PCR anidada y la IFAT. Dsp = 99,7%. Dse = 100%. 30% de inhibición determinada por el análisis ROC.	1. 358 bovinos no infectados de rebaños lecheros mantenidos en establos libres de garrapatas y sin antecedentes clínicos de anaplasmosis clínica 2. 135 sueros que se sabe que son positivos definidos por PCR anidada. 3. Comparación intraprueba con 163 muestras de diagnóstico con posibles falsos positivos basados en C-ELISA rMSP5-GST. Confirmación positiva de la prueba realizada con IFAT	Véase la referencia.	1. Versión actualizada con mayor especificidad 2. Alta sensibilidad, detecta animales persistentemente infectados 3. Disponible en el mercado 4. Utiliza un antígeno estandarizado 5. El antígeno diana está muy conservado entre las cepas de <i>A. marginale</i> , por lo que detecta la infección por todas las cepas de <i>A. marginale</i> 6. Rápido	1. No diferencia entre infección por <i>A. marginale</i> y <i>A. centrale</i> 2. Puede dar reacciones cruzadas con anticuerpos <i>anti-Ehrlichia</i> 3. Puede no estar disponible en todos los países 4. Requiere un lector de absorbancia de microplacas.	Chung et al., 2014.

¹RLB Es la prueba de transferencia lineal inversa.

Apéndice 3: Anaplasmosis bovina
Finalidad prevista de la prueba: contribuir a las políticas de erradicación

Prueba con puntuación y especies	Tipo de muestra y analitos diana	Exactitud	Población problema	Informe de validación	Ventajas	Inconvenientes	Referencias
C-ELISA +++ Bovino	Suero rMSP5-GST	Las pruebas de referencia fueron la PCR anidada y la IFAT. Dsp = 99,7%. Dse = 100%. 30% de inhibición determinada por el análisis ROC	1. 358 bovinos no infectados de rebaños lecheros mantenidos en establos libres de garrapatas y sin antecedentes clínicos de anaplasmosis clínica 2. 135 sueros positivos conocidos definidos por PCR anidada 3. Comparación intraprueba con 163 muestras de diagnóstico con posibles falsos positivos basados en rMSP5-GST C-ELISA. Confirmación positiva de la prueba realizada con IFAT	Véase la referencia.	1. Versión actualizada con mayor especificidad 2. Alta sensibilidad, detecta animales persistentemente infectados 3. Disponible en el mercado 4. Utiliza un antígeno estandarizado 5. El antígeno diana está muy conservado entre las cepas de <i>A. marginale</i> , por lo que detecta la infección por todas las cepas de <i>A. marginale</i> 6. Rápido	1. No diferencia entre infección por <i>A. marginale</i> y <i>A. centrale</i> 2. Puede dar reacciones cruzadas con anticuerpos anti- <i>Ehrlichia</i> 3.3. Puede no estar disponible en todos los países 4. Requiere un lector de absorbancia de microplacas 5. Bajo porcentaje de falsos positivos.	Chung et al., 2014)

Apéndice 4: Anaplasmosis bovina
Finalidad prevista de la prueba: confirmación de casos clínicos

Prueba con puntuación y especies	Tipo de muestra y analitos diana	Exactitud	Población problema	Informe de validación	Ventajas	Inconvenientes	Referencias
Examen microscópico +++	Sangre entera	No se ha publicado validación robusta	N/A	N/A	1. La mayoría de los laboratorios tienen capacidad para hacer y examinar frotis de sangre 2. Eritrocitos infectados por <i>A. marginale</i> fácilmente visibles en animales clínicamente afectados.	1. Las colonias de <i>A. marginale</i> son pequeñas y puede ser difícil diferenciarlas de los restos si el animal tiene una rickettsemia baja. 2. Requiere experiencia para identificar las colonias de <i>A. marginale</i> 3. Difícil diferenciar entre <i>A. marginale</i> y <i>A. centrale</i>	
PCR +++	Sangre entera Varias dianas génicas	Se ha publicado una validación parcial	51 bovinos de 18 rebaños de tres regiones del sur de Italia fueron sometidos a pruebas de detección de <i>A. marginale</i> , <i>A. centrale</i> , <i>A. bovis</i> , <i>T. buffeli</i> , <i>B. bovis</i> , <i>A. phagocytophilum</i> y <i>B. bigemina</i> . Todos los bovinos, excepto 4, resultaron positivos para al menos uno de estos agentes patógenos.	Véase la referencia.	Buena concordancia notificada entre la PCR anidada y la PCR en tiempo real. Alta sensibilidad analítica (10 ¹ copias de ADN).	1. Debe realizarse en un laboratorio equipado para extraer ADN y disponer de termocicladores para PCR en tiempo real. 2. Es importante utilizar la PCR junto con el diagnóstico de anemia y frotis sanguíneo, ya que la PCR puede detectar rickettsemia de bajo nivel, lo que puede llevar a un diagnóstico erróneo.	Carelli et al., 2007

N/A: no disponible.

¹RLB Es la prueba de transferencia lineal inversa.

Apéndice 5: Anaplasmosis bovina
Finalidad prevista de la prueba: determinar la prevalencia de la infección – vigilancia

Prueba con puntuación y especies	Tipo de muestra y analitos diana	Exactitud	Población problema	Informe de validación	Ventajas	Inconvenientes	Referencias
CAT +	Suero Lisados de <i>A. marginale</i> aislados de glóbulos rojos.	La prueba de referencia fue el frotis sanguíneo. DSe 84,1 ¹ -100 ² %. Dsp 97,9 ¹ -98,6 ² %.	48 bovinos criados en región libre de anaplasmosis. 82 animales de la región endémica. ¹ 86 sueros procedentes de bovinos infectados experimentalmente y 183 sueros procedentes de una zona libre de <i>A. marginale</i> ²	Véase la referencia	1. Puede hacerse en condiciones de campo o en el laboratorio.	1. El antígeno derivado del ganado infectado es difícil de producir y estandarizar 2. Pueden dar falsos negativos y falsos positivos 3. Variación entre pruebas dependiendo de las condiciones ambientales y del laboratorio	¹ Gonzalez <i>et al.</i> , 1978. ² Molloy <i>et al.</i> , 1999.
C-ELISA +++ Bovino	Suero rMSP5-GST	Las pruebas de referencia fueron la PCR anidada y la IFAT. Dsp = 99,7%. Dse = 100%. 30% de inhibición determinada por el análisis ROC	1. 358 bovinos no infectados de rebaños lecheros mantenidos en establos libres de garrapatas y sin antecedentes clínicos de anaplasmosis clínica 2. 135 sueros positivos conocidos definidos por PCR anidada 3. Comparación intraprueba con 163 muestras de diagnóstico con posibles falsos positivos basados en rMSP5-GST C-ELISA. Confirmación positiva de la prueba realizada con IFAT	Véase la referencia	1. Versión actualizada con mayor especificidad 2. Alta sensibilidad, detecta animales persistentemente infectados 3. Disponible en el mercado 4. Utiliza un antígeno estandarizado 5. El antígeno diana está muy conservado entre las cepas de <i>A. marginale</i> , por lo que detecta la infección por todas las cepas de <i>A. marginale</i> 6. Rápido	1. No diferencia entre infección por <i>A. marginale</i> y <i>A. centrale</i> . 2. Puede presentar reacción cruzada con anticuerpos <i>anti-Ehrlichia</i> . 3. 3. Puede no estar disponible en todos los países. 4. Requiere un lector de absorbancia de microplacas. 5. Bajo porcentaje de falsos positivos	Chung <i>et al.</i> , 2014
IFAT++ Bovino	Suero Portaobjetos de vidrio con glóbulos rojos infectados por <i>A. marginale</i>	La prueba de referencia fue el frotis sanguíneo. DSe 97,6 Dsp 89,6	1. 48 bovinos criados en región libre de anaplasmosis 2. 82 animales de la región endémica	Véase la referencia	1. El antígeno es relativamente fácil de producir y conservar 2. No requiere muchos reactivos	1. Tasa de falsos positivos relativamente alta 2. Requiere mucho tiempo y mano de obra por lo que no es adecuado para un alto rendimiento 3. Requiere microscopio fluorescente y frotis sanguíneos con alta rickettsemia	Gonzalez <i>et al.</i> , 1978

Apéndice 6: Anaplasmosis bovina
Finalidad prevista de la prueba: determinar el estado inmunitario de animales específicos

Prueba con puntuación y especies	Tipo de muestra y analitos diana	Exactitud	Población problema utilizada para medir la exactitud	Informe de validación	Ventajas: opinión del experto	Inconvenientes: opinión del experto	Referencias
CAT +	Suero Lisados de <i>A. marginale</i> aislados de glóbulos rojos.	La prueba de referencia fue el frotis sanguíneo. DSe 84,1 ¹ –100 ² % Dsp 97,9 ¹ –98,6 ² %	48 bovinos criados en región libre de anaplasmosis. 82 animales de la región endémica. ¹ 86 sueros de bovinos infectados experimentalmente y 183 sueros de zona libre de <i>A. marginale</i> . ²	Véase la referencia	1. Puede realizarse sobre el terreno o en el laboratorio 2. Todos los materiales y reactivos están fácilmente disponibles	1. El antígeno derivado del ganado infectado es difícil de producir y estandarizar 2. Puede dar falsos negativos y falsos positivos 3. Variación en el rendimiento de la prueba dependiendo del laboratorio	¹ Gonzalez <i>et al.</i> , 1978 ² Molloy <i>et al.</i> , 1999
C-ELISA +++ Bovino	Suero rMSP5-GST	Las pruebas de referencia fueron la PCR anidada y la IFAT Dsp = 99,7%. Dse = 100% 30% de inhibición determinada por el análisis ROC	1. 358 bovinos no infectados de rebaños lecheros mantenidos en establos libres de garrapatas y sin antecedentes clínicos de anaplasmosis clínica 2. 135 sueros que se sabe que son positivos definidos por PCR anidada 3. Comparación intraprueba con 163 muestras de diagnóstico con posibles falsos positivos basados en rMSP5-GST C-ELISA. Confirmación positiva de la prueba realizada con IFAT	Véase la referencia	1. Versión actualizada con mayor especificidad 2. Alta sensibilidad, detecta animales persistentemente infectados 3. Disponible en el mercado 4. Utiliza un antígeno estandarizado 5. El antígeno diana está muy conservado entre las cepas de <i>A. marginale</i> , por lo que detecta la infección por todas las cepas de <i>A. marginale</i> 6. Rápido	1. No diferencia entre infección por <i>A. marginale</i> y <i>A. centrale</i> 2. Puede dar reacciones cruzadas con anticuerpos anti- <i>Ehrlichia</i> 3. Puede no estar disponible en todos los países 4. Requiere un lector de absorbancia de microplacas 5. Bajo porcentaje de falsos positivos	Chung <i>et al.</i> , 2014
IFAT++ Bovino	Suero Portaobjetos de vidrio con hematíes infectados por <i>A. marginale</i> .	La prueba de referencia fue el frotis sanguíneo. DSe 97,6% Dsp 89,6%	1. 48 bovinos criados en región libre de anaplasmosis 2. 82 animales de la región endémica	Véase la referencia	1. El antígeno es relativamente fácil de producir y almacenar 2. No requiere muchos reactivos	1. Tasa relativamente alta de falsos positivos 2. Requiere mucho tiempo y mano de obra, por lo que no es adecuado para un alto rendimiento. 3. Requiere microscopio fluorescente y frotis sanguíneos. con alta rickettsemia	Gonzalez <i>et al.</i> , 1978