

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, se han incluido recientemente en el género, pero no se ha observado que causen enfermedad clínica. Este microorganismo se adscribe al género *Anaplasma*, perteneciente a la familia *Anaplasmataceae*, del orden *Rickettsiales*.

Descripción de la enfermedad: Los signos característicos de la anaplasmosis son la anemia, la ictericia y la muerte súbita. 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.

Identificación 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*. *Anaplasma phagocytophilum* y *A. bovis* solo se pueden observar infectando granulocitos, principalmente neutrófilos.

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 deseable si el estado de descomposición, después de la muerte, es avanzado.

Pruebas serológicas: Se ha demostrado que un ensayo inmunoanalítico 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 para la certificación de animales individuales 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 empleando la CF con modificaciones.

Se han utilizado **pruebas basadas en el ácido nucleico** 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 necesita una reacción anidada para identificar los portadores de bajo nivel utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y puede tener lugar una amplificación inespecífica. Recientemente, se han descrito PCR en tiempo real con una sensibilidad analítica equivalente a la PCR convencional anidada.

Requisitos para las vacunas: En varios países se usan vacunas vivas para proteger el ganado vacuno contra la infección por *A. marginale*. La vacuna que contiene *A. centrale* vivo se emplea más y confiere protección parcial contra las cepas virulentas de *A. marginale*.

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* produce una anemia moderada, pero los brotes clínicos en el campo son extremadamente infrecuentes. Se han observado nuevas especies de *Anaplasma*, *A. phagocytophilum* y *A. bovis* (Dumler *et al.*, 2001), con un reservorio principal en los roedores, que infectan al ganado vacuno, aunque no causan enfermedad clínica (Dreher *et al.*, 2005; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2004).

Los signos clínicos más destacados de la anaplasmosis son la anemia y la ictericia, y esta última tiene lugar al final de la enfermedad. No hay hemoglobinemia ni hemoglobinuria, lo cual puede ayudar a diferenciar esta enfermedad 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.

Anaplasma marginale se presenta en la mayor parte de los países tropicales y subtropicales, y en algunas regiones más templadas. *Anaplasma centrale* se describió por vez primera 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* se consideraron en principio protozoos parasitarios, pero la investigación posterior reveló que no poseían atributos que justificaran esta descripción. Desde la última revisión aceptada de la taxonomía, en 2001 (Dumler *et al.*, 2001), la familia *Anaplasmataceae* (Orden *Rickettsiales*) consta ahora de cuatro géneros: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* y *Wolbachia*. El género *Aegyptianella* se mantiene dentro de la familia *Anaplasmataceae* como género *incertae sedis*. El género *Anaplasma* revisado comprende actualmente a *Anaplasma marginale* como la especie típica. *A. phagocytophilum*, que es el agente causante de la erliquiosis granulocitaria humana (antes *Ehrlichia phagocytophila*, *E. equi*), *A. platys* y *A. bovis*. *Haemobartonella* y *Eperythrozoon* se consideran en la actualidad más próximos a los micoplasmas.

Las especies de *Anaplasma* se transmiten mecánica o biológicamente por vectores artrópodos. Varias revisiones basadas en un estudio cuidadoso de experimentos de transmisión presentan una lista de hasta 19 garrapatas diferentes capaces de transmitir experimentalmente *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2004). Estas son: *Argas persicus*, *Ornithodoros lahorensis*, *Boophilus annulatus*, *B. calcaratus*, *B. decoloratus*, *B. microplus*, *Dermacentor albipictus*, *D. andersoni*, *D. hunteri*, *D. occidentalis*, *D. variabilis*, *Hyalomma excavatum*, *H. rufipes*, *Ixodes ricinus*, *I. scapularis*, *Rhipicephalus annulatus* (antes *Boophilus annulatus*), *R. bursa*, *R. calcaratus*, *R. decoloratus*,

R. evertsi, *R. microplus*, *Rhipicephalus bursa*, *R. evertsi*, *R. sanguineus* y *R. simus*. Sin embargo, se ha cuestionado la clasificación de varias garrapatas de estos informes. La transmisión intraestadial o transestadial es el mecanismo habitual, incluso en las especies de *Rhipicephalus* de un solo hospedador. Las garrapatas macho pueden ser particularmente importantes como vectores; pueden estar infectadas de forma permanente y servir como reservorio para la infección. 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 países tales como Australia y países de África y de Latinoamérica, y algunas especies de *Dermacentor* 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* (Kocan *et al.*, 2004). 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).

Los principales vectores de *A. centrale* parecen ser garrapatas de hospedadores múltiples, propias de África, como *R. simus*. No se ha demostrado que la garrapata común de los bóvidos (*R. microplus*) sea un vector. Esto es importante 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. Así, no hay riesgo de transmisión a operarios de campo ni de laboratorio, y los laboratorios que trabajen con *A. marginale* pueden hacerlo con el nivel más bajo de bioseguridad, equivalente a BSL1.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

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

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de circulación del virus en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Examen microscópico	–	+	–	+++	–	–
Identificación del agente¹						
PCR	–	+++	–	+++	–	–
Detección de la respuesta inmunitaria						
CAT	–	–	–	–	+-	+
ELISA	+++	+	+++	–	+++	+++
IFA	+	–	–	–	++	++
CF	–	–	–	–	+	-

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.

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

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 y/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 parásitos, como puede ocurrir en la fase de recuperación de la enfermedad.

Contrariamente a lo que ocurre con *Babesia bovis*, *A. marginale* no se acumula en los capilares, de modo que es apropiada la sangre de la yugular u otro gran vaso. Debido a la morfología poco diferencial de *Anaplasma*, es esencial que los frotis estén bien preparados y libres de sustancias extrañas, pues las partículas de los restos pueden confundir el diagnóstico. Las gotas gruesas de sangre, que a veces se utilizan en el diagnóstico de la babesiosis, no son apropiadas para el diagnóstico de la anaplasmosis, porque *Anaplasma* es difícil de identificar una vez que se separa de los eritrocitos.

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 *Anaplasma*. 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 *Anaplasma*. 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 *Anaplasma*. Los frotis se examinan con el objetivo de aceite de inmersión a 700–1.000 aumentos.

Anaplasma marginale tiene aspecto de cuerpos densos, redondeados y muy coloreados dentro de los eritrocitos, de aproximadamente 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 *Anaplasma* (Kreier & Ristic, 1963; Stich *et al.*, 2004).

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 períodos 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 los parásitos 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 portador, 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. No obstante, la PCR anidada plantea serios problemas de control de calidad y de especificidad para un uso rutinario (Torioni De Echaide *et al.*, 1998). La PCR en tiempo real también se ha descrito para la identificación de *A. marginale* (Carelli *et al.*, 2007; Decaro *et al.*, 2008; Reinbold *et al.*, 2010b), y debe tenerse en cuenta en lugar de la PCR anidada. Dos ventajas de esta técnica, que emplea un solo tubo cerrado para la amplificación y para el análisis, son la baja probabilidad de contaminación del amplicón y un resultado analítico semi-cuantitativo. El equipo necesario para la PCR en tiempo real es caro, requiere un mantenimiento preventivo y algunos laboratorios tal vez no puedan permitirselo. Las PCR en tiempo real pueden acceder a uno o varios genes (Carelli *et al.*, 2007; Decaro *et al.*, 2008), o al ARNr 16S (Reinbold *et al.*, 2010b), y se ha observado que logran un nivel de sensibilidad analítica equivalente a la PCR convencional anidada (Carelli *et al.*, 2007; Decaro *et al.*, 2008; Reinbold *et al.*, 2010b).

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 laboratorios los métodos de elección para identificar los animales infectados son el enzimoimmunoanálisis 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 *Anaplasma* en frotis de sangre después de una rickettsiemia aguda y es posible que ni siquiera una PCR a punto final pueda detectar la presencia de *Anaplasma* 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 evaluación de las pruebas en las que se emplea una cantidad considerable de animales que se sabe que son positivos o negativos. En especial, hay que destacar que la capacidad de algunas pruebas de detectar infecciones conocidas de larga duración se ha enfocado de un modo inadecuado. Una excepción es la técnica C-ELISA (ver más adelante), que ha sido validada utilizando animales verdaderamente positivos y negativos, definidos mediante la PCR anidada (Torioni De Echaide *et al.*, 1998) y la prueba de aglutinación en placa, cuya especificidad y sensibilidad relativas se han evaluado comparativamente con las de C-ELISA (Molloy *et al.*, 1999). 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.

2.1. Enzimoimmunoanálisis de competición

Una técnica C-ELISA, que utiliza un antígeno recombinante denominado rMSP5 y un anticuerpo monoclonal (MAb) específico para MSP5, ha resultado muy sensible y específica para detectar animales infectados por *Anaplasma* (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2004; Reinbold *et al.*, 2010b; Strik *et al.*, 2007). Todas las cepas analizadas de *A. marginale*, *A. ovis* y *A. centrale*, expresan el antígeno MSP5 e inducen anticuerpos contra el epítipo inmunodominante reconocido por el MAb específico de MSP5. En un informe reciente se sugiere que los anticuerpos del ganado vacuno infectado experimentalmente con *A. phagocytophilum* darán positivo en la prueba C-ELISA (Dreher *et al.*, 2005). No obstante, en otro estudio no se pudo demostrar la existencia de reacción cruzada, y los MAb usados en la prueba no reaccionaron con *A. phagocytophilum* MSP5 en pruebas de unión directa (Strik *et al.*, 2007). Recientemente, se ha demostrado reactividad cruzada entre *A. marginale* y *Ehrlichia* spp. en ganado vacuno infectado de forma natural y experimental (Al-Adhami *et al.*, 2011). La prueba resultó específica al 100% utilizando 261 sueros que se sabía que eran negativos procedentes de una región no endémica, detectando con precisión el ganado vacuno infectado apenas 16 días después de la infección experimental por garrapata o por inoculación de sangre. Además, se demostró capaz de detectar el ganado que había sido infectado experimentalmente incluso 6 años antes (Knowles *et al.*, 1996). En la detección del ganado con una infección persistente en una región endémica de anaplasmosis, donde los verdaderos positivos o negativos se definieron mediante un

procedimiento de PCR anidada, el C-ELISA para la detección de rMSP5 tuvo una sensibilidad del 96% y una especificidad del 95% (Torioni De Echaide *et al.*, 1998).

Los resultados del C-ELISA para la detección del rMSP5 se pueden obtener en menos de 2,5 horas. Un kit comercial contiene las instrucciones específicas. Sin embargo, en general se realiza del modo siguiente:

2.1.1. Reactivos del equipo

Una placa de microtitulación con 96 pocillos recubiertos con el antígeno rMSP5,

Una placa de adsorción/transferencia con 96 pocillos recubiertos para la adsorción de suero y reducción de la unión de fondo,

Conjugado MaAb/peroxidasa, 100 x,

Solución de lavado y tampón para la dilución del conjugado listo para usar, 10 x,

Substrato y soluciones para detener las reacciones listas para usar,

Controles positivos y negativos

2.1.2. Procedimiento analítico

- i) Se añaden 70 µl de suero sin diluir a la placa de adsorción/transferencia recubierta y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente.
- ii) Se transfieren 50 µl del suero adsorbido por pocillo a la placa recubierta de rMSP5 y se incuba 60 minutos a temperatura ambiente.
- iii) Se elimina el suero y se lava dos veces la placa utilizando la solución de lavado, diluida.
- iv) Se añaden 50 µl por pocillo del conjugado MAb/peroxidasa diluido 1x a la placa recubierta de rMSP5, y se incuba 20 minutos a temperatura ambiente.
- v) Se elimina el conjugado MAb/peroxidasa diluido 1x y se lava la placa cuatro veces utilizando la solución de lavado diluida.
- vi) Se añaden 50 µl por pocillo, de la solución de substrato, se cubre la placa con papel de aluminio, y se incuba 20 minutos a temperatura ambiente.
- vii) Se añaden 50 µl por pocillo de la solución para detener las reacciones a la solución de substrato que ya se encuentra en los pocillos y se golpea ligeramente por los lados de la placa para mezclar el contenido de los pocillos.
- viii) Se leen inmediatamente las placas en el equipo de lectura a 620 nm.

2.1.3. Validación de la prueba

La densidad óptica (OD) media del control negativo debe estar entre 0,40 y 2,10. El porcentaje de inhibición del control positivo debe ser ≥30%.

2.1.4. Interpretación de los resultados

El porcentaje de inhibición se calcula del siguiente modo:

$$100 - \frac{\text{OD de la muestra} \times 100}{\text{OD media del control negativo}} = \text{Porcentaje de inhibición}$$

Las muestras con <30% de inhibición son negativas. Las muestras con ≥30% de inhibición son positivas.

La especificidad del C-ELISA de detección del MSP5 puede incrementarse utilizando un valor de corte del porcentaje de inhibición más alto (Bradway *et al.*, 2001); no obstante, no se ha evaluado a fondo el efecto que ese cambio pueda tener en la sensibilidad.

Recientemente, se ha desarrollado un C-ELISA mejorado de detección del MSP5 sustituyendo el rMBP-MSP5 por el rGST-MSP5, además de mejorar el método de recubrimiento con antígeno empleando un sistema de captación específico. El nuevo C-ELISA de detección del MSP5-GST es

más rápido, sencillo y específico, y mejora la resolución en comparación con el C-ELISA de detección del rMSP5-MBP con adsorción de MBP (Chung *et al.*, 2014).

2.2. Enzimoimmunoanálisis indirecto

Inicialmente se desarrolló un I-ELISA empleando un antígeno para CAT (véase abajo), que puede utilizarse cuando no se dispone de C-ELISA. A diferencia de C-ELISA, la mayoría de reactivos, como los tampones y los sustratos listos para disolver, en muchos países se venden. Cualquier laboratorio puede preparar el antígeno utilizando cepas locales de *A. marginale*. En I-ELISA se utilizan cantidades pequeñas de suero y de antígeno, y la sensibilidad y la especificidad de la prueba estandarizada con sueros que se sepa que son positivos o negativos son igual de buenas que las de C-ELISA. Como puede prepararse en todos los laboratorios, aquí solo se describe el procedimiento general (Barry *et al.*, 1986). En el caso de los kits comerciales, deben seguirse las instrucciones del fabricante. Y en el caso del I-ELISA para uso interno, puede consultarse la publicación de Barry *et al.* 1986. Los cuerpos y membranas iniciales se obtienen igual que en la fijación del complemento (Rogers *et al.*, 1964). Este antígeno se trata con dodecil sulfato de sodio al 0,1% durante 30 minutos antes de fijar el antígeno a la placa de microtitulación. En cada laboratorio deberá ajustarse la cantidad concreta de antígeno para optimizar la lectura y minimizar el gasto.

Los resultados del I-ELISA pueden leerse en 4 a 5 horas. 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* crudo, 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 subapartado 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 realizan tres lavados con PBST20.
- 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, 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.

A los efectos de evaluar la coherencia del operario que lleva a cabo la prueba, el error "E" también debe estimarse; se calcula determinando el porcentaje que supone la desviación estándar de cualquier suero respecto a su valor medio.

2.3. Prueba de aglutinación en placa

Las ventajas de la CAT son que es una técnica sensible, 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 una suspensión de partículas de *A. marginale*, puede ser difícil de preparar y puede variar de un lote a otro y de un laboratorio a otro. Se infectan terneros esplenectomizados mediante la inoculación intravenosa con sangre que contenga eritrocitos infectados por *Anaplasma*. 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 las partículas de *Anaplasma* se centrifugan. Los sedimentos se sonicen, 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:

2.3.1. 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 CAT². 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 conglutinina. Si se desconoce el nivel de conglutininas, 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.

2 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).

- 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.

2.4. Prueba de fijación de complemento

La prueba de fijación del complemento (CF) se ha utilizado ampliamente durante muchos años. Sin embargo, muestra una sensibilidad variable (de entre el 20% y el 60%), reflejando seguramente las diferencias entre las técnicas de producción de antígeno, y una mala reproducibilidad. Además, se ha demostrado que es muy alta la proporción de ganado portador que no se consigue detectar mediante la prueba de fijación del complemento (Bradway *et al.*, 2001). Tampoco existe la certeza de que la CF sirva para identificar anticuerpos en animales con una infección aguda si se aplica con anterioridad a otras pruebas (Coetzee *et al.*, 2007; Molloy *et al.*, 1999). Por consiguiente, la CF ya no se recomienda como prueba fiable para detectar animales infectados.

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. 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 (Al-Adhami *et al.*, 2011).

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 (McHardy, 1984). Se ha publicado una revisión de las vacunas contra *E. marginale* y sus antígenos (Kocan *et al.*, 2003). 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 en que la enfermedad es exótica, 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 que provocan la enfermedad son de una virulencia moderada (como Australia) (Bock & de Vos, 2001). En los trópicos húmedos, donde *A. marginale* parece ser una rickettsia muy virulenta, 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) y 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 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, 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, la glosopeda o fiebre aftosa y la peste bovina. 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 del 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 prepara 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.

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 no puede cultivarse *in vitro*. 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 *Anaplasma* 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

Después de una inoculación se logra inmunidad parcial, pero duradera. No existen pruebas de que la repetición de la vacunación tenga un efecto estimulante. La vacuna se emplea para el control de la anaplasmosis clínica en zonas 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., LOVANOV 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.

BOCK R., JACKSON L., DE VOSA. & 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.

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., DE LA FUENTE J., BLOUIN E.F. & GARCIA-GARCIA J.C. (2004). *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*, **129**, S285–S300.

KOCAN K.M., DE LA FUENTE J., GUGLIELMONE A.A. & MELENDÉZ R.D. (2003). Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbiol. Rev.*, **16**, 698–712.

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.

KREIER J.P. & RISTIC M. (1963). Anaplasmosis. X Morphological characteristics of the parasites present in the blood of calves infected with the Oregon strain of *Anaplasma marginale*. *Am. J. Vet. Res.*, **24**, 676–687.

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., STÄRCK 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.

MCHARDY N. (1984). Immunization against anaplasmosis: a review. *Prev. Vet. Med.*, **2**, 135–146.

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.

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.

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.

ROGERS T.E., HIDALGO R.-J. & DIMOPOULLOS G.T. (1964). Immunology and serology of *Anaplasma marginale*. I. Fractionation of the complement-fixing antigen. *J. Bacteriol.*, **88**, 81–86.

STICH R.W., OLAH G.A., BRAYTON K.A., BROWN W.C., FECHHEIMER M., GREEN-CHURCH K., JITTAPALAPONG S., KOCAN K.M., MCGUIRE T.C., RURANGIRWA F.R. & PALMER G.H. (2004). Identification of a novel *Anaplasma marginale* appendage-associated protein that localizes with actin filaments during intraerythrocytic infection. *Infect Immun.*, **72**, 7257–7264.

STRIK N.I., ALLEMAN A.R., BARBET A.F., SORENSON H.L., WANSLEY 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 OIE para la anaplasmosis
(puede consultarse la página web de la OIE:

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

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

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2015.