

COWDRIOSIS (HIDROCARDITIS)

RESUMEN

La cowdriosis (también conocida como heartwater) es una enfermedad producida por rickettsias en los rumiantes, causada por *Ehrlichia ruminantium* (anteriormente *Cowdria ruminantium*) y transmitida por garrapatas *Amblyomma*. Tiene lugar en casi todos los países de África y en Madagascar, y también en el Caribe, amenazando al continente americano.

Desde el punto de vista clínico, la enfermedad se caracteriza por fiebre alta repentina, frecuente hidropericardio, edema pulmonar y, en las formas agudas e hiperagudas, por trastornos nerviosos y alta mortalidad. También se produce la cowdriosis subaguda, con una tasa alta de recuperaciones.

Los animales salvajes pueden jugar un papel importante ya que son el reservorio de la enfermedad. El ciervo tipo *Rusa* parece ser el único rumiante en el cual la cowdriosis tiene impacto económico.

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

La sangre fresca recogida de animales sospechosos puede inocularse intravenosamente en cabras u ovejas susceptibles. El desarrollo de síntomas clínicos y la presencia de *Ehrlichia* en el cerebro de los animales inoculados son claves para el diagnóstico de la cowdriosis.

Ehrlichia ruminantium puede aislarse de la sangre de un hospedador infectado utilizando cultivos con células endoteliales de rumiantes. Cuando se produce un efecto citopático que consiste en la formación de placas de lisis celular, se confirma la presencia de mórulas características por tinción de la monocapa celular con azul de metileno y eosina o mediante técnicas de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa usando un antisuero específico.

Se dispone de sondas de ADN y especialmente de técnicas más sensibles basadas en la reacción en cadena de la polimerasa para revelar la presencia de *E. ruminantium* en la sangre de animales infectados activamente y en menor grado en la sangre o médula ósea de animales portadores y en las garrapatas que actúan como vector. La técnica de PCR tiene un amplio uso en la investigación del genoma de *Ehrlichia* y en estudios epidemiológicos, además de su uso diagnóstico.

Pruebas serológicas: Las pruebas serológicas incluyen pruebas de inmunofluorescencia indirecta, enzimoimmunoensayos (ELISA) e inmunotransferencia (Western blotting). Sin embargo,

cuando se usan células completas de *Ehrlichia* como antígeno, se producen reacciones cruzadas con otras especies de *Ehrlichia* en todas las pruebas.

Dos ensayos inmunoenzimáticos desarrollados recientemente, que utilizan como antígenos la principal proteína antigénica 1 recombinante (MAP1)- el ensayo ELISA MAP1B y el ensayo ELISA competitivo MAP1- presentan una notable mejora en especificidad en comparación con las pruebas previas, lo que hace más fiable la interpretación de los resultados serológicos en regiones donde se producen infecciones por *Ehrlichia* en rumiantes. Estas pruebas pueden ser útiles para controlar las infecciones experimentales, examinar el estado inmunológico de animales inmunizados, y analizar el estado de los animales antes de la importación.

Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico: aún se lleva a cabo en algunos países la inmunización contra la cowdriosis por el método de "infección y tratamiento" usando garrapatas de *Amblyomma* pre-alimentadas con sangre infectada u homogeneizada. Una vacuna de primera generación que consiste en cuerpos elementales de *E. ruminantium* purificados e inactivados, emulsionados en adyuvante Montanide ISA 50 ha dado resultados prometedores en condiciones experimentales controladas, y se está evaluando en áreas endémicas. En un futuro próximo, podría reemplazar al método de infección y tratamiento, que presenta dificultades prácticas.

A. INTRODUCCIÓN

La cowdriosis (*heartwater*) es una enfermedad de rumiantes salvajes y domésticos producida por rickettsias, causada por *Ehrlichia ruminantium* (anteriormente *Cowdria ruminantium*) y transmitida por garrapatas *Amblyomma* (2, 6, 23). También se la conoce con los sinónimos malkopsiekte (África), pericarditis exudativa infecciosa (Francia), hidrocarditis infecciosa (Portugal), hidropericarditis de los rumiantes (Italia), y una gran variedad de nombres en diferentes lenguas africanas (5). *Ehrlichia ruminantium* se clasifica en el orden Rickettsiales, tribu *Ehrlichieae*, junto con el género *Anaplasma*.

La cowdriosis se da en casi todos los países subsaharianos de África donde las garrapatas *Amblyomma* están presentes y en las islas circundantes: Madagascar, Reunión, Mauricio, Zanzíbar, las Islas Comoro y Santo Tomé. La enfermedad ha sido también descrita en el Caribe (Guadalupe, María Galante y Antigua) (21), desde donde amenaza al continente americano. Todos los rumiantes domésticos y salvajes pueden resultar infectados, pero los primeros parecen ser más susceptibles. Los rumiantes domésticos indígenas son generalmente más resistentes a la enfermedad. Los animales salvajes podrían jugar un papel importante como reservorio, pero el ciervo *Rusa* parece ser el único rumiante salvaje en el cual la cowdriosis tiene un impacto económico.

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

La fiebre va seguida de inapetencia, algunas veces apatía, diarrea, particularmente en el ganado vacuno (3), y disnea, indicativa de edema pulmonar. Los trastornos nerviosos se desarrollan gradualmente. El animal está inquieto, camina en círculos, hace movimientos de succión y está de pie muy rígido con temblores en los músculos superficiales. El ganado vacuno puede empujar su cabeza contra una pared o presentar comportamiento agresivo o ansioso. Finalmente, el animal cae al suelo, moviendo sus patas como en pedaleo y mostrando opistótonos, nistagmos y movimientos de masticación. El animal muere generalmente durante un ataque nervioso o inmediatamente después.

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

Las lesiones macroscópicas más comunes son hidropericardio, hidrotorax, edema pulmonar, congestión intestinal, edema de los nódulos linfáticos mediastínicos y bronquiales (3), petequia del epicardio y endocardio, congestión del cerebro y esplenomegalia moderada.

Un diagnóstico provisional de cowdriosis se basa en la presencia de vectores de *Amblyomma*, de trastornos nerviosos clínicos, y de transudados en el pericardio y en el tórax en el examen post-mortem. Debería hacerse un diagnóstico clínico diferencial con la babesiosis cerebral bovina y la teileriosis, la anaplasmosis, botulismo e infección por nemátodos (haemonchiosis) de los pequeños rumiantes.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

Se pueden observar colonias típicas de *E. ruminantium* en frotis del cerebro después de la muerte.

No es necesario llevar a cabo la tediosa labor de abrir el cráneo. Un método alternativo (26) consiste en cortar la cabeza por la primera vértebra cervical. Después se introduce una cucharilla a través del foramen magnum, entre la médula y las meninges. Se vuelve la cucharilla hacia el cerebro y se retira con un trozo de cerebelo. Otro método sencillo consiste en hacer un agujero en el cráneo con un martillo y un clavo largo y aspirar una muestra de corteza cerebral con una aguja unida a una jeringa. Estos métodos también disminuyen el riesgo para el operador en los casos en los que los trastornos nerviosos han sido producidos por rabia.

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

Las colonias de *Ehrlichia* aún están presentes 48 horas después de la muerte en un cerebro mantenido a temperatura ambiente y hasta 34 días en un cerebro almacenado en un refrigerador (4).

Se coloca un fragmento pequeño de materia gris (de tamaño aproximado a una cabeza de cerilla) en un porta de microscopio, aplastado por otro porta y, mientras se mantiene la presión, los portas se deslizan a lo largo uno sobre otro para producir una monocapa celular. Los portas se secan al aire, se fijan en metanol, se tiñen con Giemsa diluida con tampón Sørensen (2,54 g KH_2PO_4 ; 8,55 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; cantidad suficiente para 5 litros con agua destilada), pH 7,2, y lavado con agua del grifo. Tinciones rápidas Giemsa (DiffQuick, RAL555, tinción de Field, tinción rápida de CAM) proporcionan resultados más rápidos, pero el contraste de color es generalmente más pobre. Algunas tinciones "rápidas" proporcionan un contraste excelente, por ejemplo la tinción Hema 3.

Los portas se examinan al microscopio con un aumento bajo (objetivo x10) para localizar los capilares cerebrales. Para identificar las colonias de rickettsias resulta útil una lente para aceite de inmersión con un aumento de al menos x50. Se necesita experiencia para identificar colonias de *Ehrlichia* y para diferenciarlas de otros parásitos de la sangre (*Babesia bovis*), de ciertas células sanguíneas (trombocitos, granulocitos), de estructuras subcelulares normales (mitocondrias, gránulos de mastocitos), o artefactos de la tinción (precipitados del colorante), etc. Se puede mejorar la especificidad de la lectura tiñendo secciones del cerebro fijadas con formalina utilizando técnicas de inmunoperoxidasa.

Las colonias de *Ehrlichia* están formadas por agrupaciones de gránulos (0,2-0,5 μm), organizados a veces formando un anillo o una herradura (1-3 μm), situados cerca del núcleo dentro de la célula endotelial. Los gránulos pueden ser escasos, particularmente en casos hiperagudos, pero se encuentran siempre en el cerebro de los animales que han muerto de cowdriosis. Sin embargo, si el animal fue tratado con fármacos 24 horas antes, los gránulos de *Ehrlichia* tienden a fundirse, lo que hace que el diagnóstico sea muy difícil, y a veces imposible.

La sangre fresca completa recogida de animales sospechosos puede inocularse intravenosamente a una oveja o cabra susceptible. El desarrollo de síntomas clínicos y la evidencia de *Ehrlichia* en el cerebro del rumiante inoculado constituyen un diagnóstico de la cowdriosis.

Se ha utilizado microscopía electrónica de transmisión para demostrar que los organismos de *Ehrlichia* se desarrollan dentro de una estructura vacuolar, rodeada de una membrana en el citoplasma de la célula endotelial (25). Cada organismo está rodeado por una membrana doble. Dentro de la estructura vacuolar, se identifican formas de *Ehrlichia* densas a los electrones (cuerpos elementales), así como formas reticuladas intermedias.

a) Aislamiento de *Ehrlichia ruminantium* usando cultivos *in-vitro*

El aislamiento de *E. ruminantium* en cultivos celulares no es la prueba elegida para confirmar el diagnóstico de cowdriosis, ya que el procedimiento de laboratorio es largo, aunque muchas líneas celulares permiten su crecimiento. Sin embargo, el aislamiento de *Ehrlichia* es necesario para tipificar las cepas presentes en una región a efectos de los programas de vacunación. Se puede aislar *Ehrlichia* de la sangre de los animales infectados por cultivo sobre células endoteliales de rumiantes. Las células endoteliales del cordón umbilical, la aorta o la arteria pulmonar de diferentes especies de rumiantes (ganado vacuno, cabras, ovejas) se utilizan a menudo para el aislamiento, aunque se han descrito otros tipos de células endoteliales (capilares del cerebro, células endoteliales circulantes, etc.) para el cultivo rutinario de microorganismos. Líneas

celulares endoteliales de marta, antílope orix, búfalo, kudo, y el cerdo salvaje se pueden utilizar también para cultivar *E. ruminantium*. No se han designado aún líneas celulares estándar para aislamiento.

- **Procedimiento de aislamiento**

- i) La sangre del animal infectado se recoge en anticoagulante (heparina o citrato sódico) y se diluye a 1/2 en el medio de cultivo que consiste en el medio mínimo esencial de Glasgow (MEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado, 2,95 mg/ml de caldo de triptosa y fosfato, 200 mM de L-glutamina, y antibióticos si es preciso (penicilina 100 unidades internacionales/ml, estreptomycin 100 µg/ml).
- ii) El medio de cultivo se elimina de la monocapa celular endotelial y se añade sangre infectada (aproximadamente 2 ml para una botella de 25 cm²). La botella se incuba a 37°C en un agitador rotatorio durante 2 horas.
- iii) Después de la incubación, se elimina la sangre y la monocapa se lava cuidadosamente tres veces con medio de cultivo precalentado. Se añade medio de cultivo fresco y la botella se incuba a 37°C. El medio se cambia dos veces por semana.

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

- Se siembran 4 ml de plasma sobre un cultivo celular endotelial susceptible y se incuban durante 1 hora a 37°C en un agitador rotatorio.
 - Se retira el plasma lavándolo con medio de cultivo y se añaden 5 ml de medio de crecimiento (por botella de 25 cm²) y se observa el desarrollo del efecto citopático.
- iv) La monocapa se inspecciona regularmente para observar la aparición de pequeñas placas de lisis celular. Las primeras placas aparecen generalmente después de dos semanas. El pase a monocapas celulares sin infectar se lleva a cabo cuando la lisis alcanza el 80% de la capa celular. Las células restantes se tiñen con azul de metileno y eosina y se examinan microscópicamente para detectar la presencia de mórulas de *E. ruminantium*. Alternativamente, se pueden teñir las células mediante una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) o mediante una prueba con inmunoperoxidasa, utilizando un antisuero específico de *Ehrlichia*.

b) Aislamiento de *Ehrlichia ruminantium* utilizando cultivos *in-vivo*.

Es posible evaluar la presencia de cowdriosis en una manada, región o país, o aislar una cepa de *Ehrlichia* inoculando sangre o un homogenado de garrapata en un animal susceptible. La sangre de animales individuales, o sangre del colectivo, se inyecta lentamente a una dosis de 10-100 ml por vía intravenosa a un oveja o cabra susceptible. Otro método consiste en recoger y homogeneizar garrapatas *Amblyomma* adultas, y después de centrifugar el homogenado, inocular el sobrenadante resultante. El último método es muy sensible porque la concentración de *Ehrlichia* es más alta en las garrapatas que en la sangre. Sin embargo, la tasa de infección de garrapatas es variable y a veces tan baja como el 1% (5). En este caso, para detectar una infección, se necesitan al menos 100 garrapatas y se deben utilizar tantas como sea posible. En ambos casos, el inóculo se puede almacenar con 10% de dimetil sulfóxido en nitrógeno líquido durante varios años. Hay que tener en cuenta que la inoculación de homogenados de garrapatas en animales susceptibles puede causar anafilaxia, lo que se puede evitar mediante la administración simultánea de adrenalina. El desarrollo de síntomas clínicos y la detección de bacterias circulantes mediante métodos moleculares y/o la existencia de *Ehrlichia* en el cerebro del rumiante inoculado son diagnósticos de cowdriosis.

2. Métodos moleculares

a) Detección de *Ehrlichia ruminantium* utilizando sondas de ADN

Se ha clonado un fragmento específico de ADN genómico para *E. ruminantium* y se ha utilizado como sonda de ácido nucleico (29). Reconoce todas las cepas de *E. ruminantium* probadas hasta ahora. Esta sonda, llamada pCS20, detecta fácilmente la infección en animales clínicamente enfermos y garrapatas *Amblyomma* infectadas experimentalmente. Sin embargo, no es suficientemente sensible para detectar a la mayoría de los animales portadores y/o infecciones de bajo nivel en garrapatas. Sin embargo, se ha demostrado que la sonda pCS20 es más sensible que las sondas 16S y MAP1 (proteína 1 antigénica más importante) para la detección de *E. ruminantium* en garrapatas cuando hibridan sobre el producto del fragmento de ADN homólogo amplificado por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (1).

b) Detección de *Ehrlichia ruminantium* utilizando PCR y PCR anidada

A partir de la secuencia de ADN de la sonda pCS20 (15) se han diseñado dos cebadores -AB128 y AB129- para uso en PCR. Una modificación del método PCR consiste en la transferencia de la sonda pCS20 sobre

el fragmento de amplificación en un paso adicional, que origina un aumento de 10 veces en la sensibilidad (24). Se ha demostrado que esta última técnica (PCR/hibridación) es 350 veces más sensible que la sonda de ácido nucleico sola. Se han detectado por PCR niveles bajos de infección en animales y en garrapatas alimentadas de animales portadores, mientras que una reacción de hibridación con la sonda de pCS20 sola resulta generalmente negativa (24). Desde el punto de vista experimental, se encontró que el límite de detección del ensayo convencional de PCR estaba entre 10 y 10² organismos, mientras que después de la PCR/hibridación estaba entre 1 y 10 organismos. Se ha demostrado la utilidad de la técnica PCR/hibridación para detectar 37 cepas de todas las áreas endémicas con una especificidad del 98%. Sin embargo, la sensibilidad del ensayo PCR es variable, oscilando entre 97 a 88% con muestras de garrapatas que contienen 10⁷ a 10⁴ organismos, y cayendo hasta 61% y 28% con muestras que contienen 10³ y 10² organismos, respectivamente (22). Consecuentemente, la tasa de 86% de garrapatas que dan positivo en las pruebas cuando se alimentan de animales infectados cayó al 21% cuando se alimentan de animales portadores debido a una rickettsemia más baja en tales animales.

También se ha desarrollado una PCR anidada dirigida al mismo fragmento de ADN pCS20 (18). El par de cebadores externos incluye el cebador AB128 con sentido junto con un cebador llamado AB130 anti sentido. Estos amplifican un fragmento de 413 bp usado como matriz en una segunda vuelta de PCR utilizando AB128 y AB129 como cebadores internos. El uso de los cebadores AB128 y AB129 evita la necesidad de repetir una evaluación completa de la especificidad de la prueba. La PCR anidada muestra una mejora en sensibilidad de 2 log 10 si se la compara con una simple PCR, y un límite de detección promedio de 6 organismos. La implicación directa de esto fue un aumento en el índice de detección en garrapatas salvajes del 1,7% al 36% en un estudio epidemiológico en el Caribe. El límite de detección es comparable al del método de PCR/hibridación que, sin embargo, es mucho más complejo y largo de realizar. La PCR anidada con pCS20 permitió la detección regular de organismos de *E. ruminantium* en garrapatas, sangre, cerebro y pulmones de animales infectados, tanto si las muestras fueron procesadas frescas o después de la congelación o conservación en etanol al 70%.

Se ha desarrollado una PCR anidada dirigida al gen polimórfico *map1* completo en paralelo para tipificar las cepas por el polimorfismo de los fragmentos de restricción o secuenciando el fragmento de amplificación directamente de las muestras patológicas que dan positivo en la PCR anidada con pCS20 (18). Se observa una gran diversidad genética de *E. ruminantium* en el campo que influye en la formulación de vacunas y ha de ser investigado con más detenimiento. La PCR anidada con *map1* funciona bien aunque con una sensibilidad ligeramente más baja que la PCR anidada con pCS20. Su límite de detección se evaluó en alrededor de 60 organismos y solamente el 91% de las muestras que resultaron positivas en la PCR anidada con pCS20 también dieron positivo en la PCR anidada con *map1*; algunos positivos de baja intensidad encontrados usando la PCR anidada con pCS20 resultaron negativos en la PCR con *map1*.

Aunque los métodos PCR han resultado ser muy efectivos para detectar infección en garrapatas o en muestras de animales durante la fase clínica de la enfermedad o después de la muerte, solamente se han llevado a cabo estudios limitados para evaluar su valor en rumiantes sanos portadores. *Ehrlichia ruminantium* se puede encontrar fácilmente en la sangre de animales infectados inmediatamente antes del comienzo del periodo febril o unos cuantos días después de la recuperación, pero después de esto parece ausente de la circulación a un nivel detectable durante periodos largos. En un estudio en Zimbabwe solo dieron positivos entre 3,3 y 26,7% del ganado vacuno, y 23,3% de las cabras mientras que casi 100% de ellos habían sido infectados con *Ehrlichia* (13). No se sabe si la falta de detección de la enfermedad en la mayoría de los animales portadores se debe a una sensibilidad insuficiente de los métodos PCR para detectar rickettsemia muy baja, o se debe a una liberación intermitente de organismos en la circulación. Una técnica útil para confirmar el estado de un animal portador sospechoso, cuya sangre es negativa por PCR, es alimentar lotes de garrapatas sobre el animal y después probar las garrapatas mediante PCR. No se sabe si las garrapatas actúan simplemente concentrando organismos circulantes o también amplificando su número o incluso induciendo la liberación de microorganismos en la circulación durante la alimentación.

Los cebadores 32F1 y 32R1 diseñados de la secuencia del gen MAP1 de *E. ruminantium* se usaron con éxito en una PCR para detectar el patógeno en la sangre y en la médula ósea de ovejas portadoras y ungulados salvajes africanos, pero el método no ha sido evaluado ni utilizado con amplitud.

c) Detección de *Ehrlichia ruminantium* utilizando la técnica de transferencia lineal inversa

La técnica de transferencia lineal inversa (RLB) se ha utilizado para la detección e identificación simultáneas de las especies de *Anaplasma* y *Ehrlichia* que se sabe que existen en rumiantes sobre la base de las diferencias en el gen de la subunidad pequeña del ARNr (2). Los cebadores 16S8FE y B-GA1B-nuevo se diseñaron a partir de dominios conservados y se utilizaron para amplificar un fragmento de 492-498 bp del gen del ARNr 16S atravesando la región V1 variable. Se diseñaron sondas de oligonucleótidos con especificidad de especie en este asa V1 para permitir la detección específica de *E. ruminantium*, *E. ovina*, *E. sp.* Cepa Omatjenne, *Anaplasma marginale*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. ovis* y *A. phagocytophilum*. También se diseñó una sonda de oligonucleótido de reacción cruzada con todas las especies (sonda

general) para que sirviera como control en el caso de que un producto PCR no hibridará con ninguna de las sondas con especificidad de especie. En el método, las sondas con especificidad de especie se unen covalentemente a la membrana de hibridación, que se hibrida con el producto de la PCR obtenido utilizando los cebadores 16S8FE y B-GA1B-nuevo. Se demostró que los productos PCR obtenidos de los microorganismos mencionados anteriormente se unían solo con sondas de oligonucleótidos específicos. No se detectó ningún producto PCR ni se produjo ninguna hibridación cuando se aplicó PCR-RLB a *Theileria annulata*, *Babesia bigemina* o ADN de mamífero. De forma similar, las garrapatas control negativas fueron siempre negativas en la prueba RLB mientras que se pudo detectar infección por *Ehrlichia ruminantium* en 15-70% de las garrapatas alimentadas de ovejas infectadas experimentalmente o portadoras crónicas. En Mozambique, se pudo detectar *E. ruminantium* en la sangre de 12 pequeños rumiantes colocados en el campo con los animales infectados; se detectó infección mixta en cinco de los animales centinela infectados, demostrando de esa forma la utilidad del método para detectar múltiples infecciones. Sin embargo, no se ha determinado aún la sensibilidad del ensayo y se necesita validar esta técnica en estudios epidemiológicos amplios.

- **Lectura de los resultados**

Teniendo en cuenta que *E. ruminantium* es una bacteria intracelular obligada que no puede cultivarse en medios acelulares y que su aislamiento es complejo y dura varias semanas, las técnicas de detección molecular son los métodos mejores para el diagnóstico de cowdriosis. La PCR es más fácil de llevar a cabo y más sensible que las sondas de ADN. Sin embargo, en las pruebas PCR hay que tener cuidado de asegurar que no se produzca contaminación cruzada entre las muestras. Se deben incluir controles positivos y negativos en cada prueba. Considerando que la serología de la cowdriosis tiene muchas limitaciones (ver Sección B.3.), la PCR podría utilizarse para confirmar los resultados serológicos cuando, por ejemplo, animales seronegativos de un área endémica deben llevarse a un área de riesgo (con presencia de vectores potenciales) libre de cowdriosis. Sin embargo, a pesar de los interesantes resultados experimentales para detectar portadores subclínicos, no hay suficiente información disponible sobre la fiabilidad de la detección de portadores por PCR, y se necesita más investigación antes de diseñar una prueba estándar de sensibilidad conocida. Los resultados actuales obtenidos con la PCR, la PCR anidada o la prueba RLB, muestran que la detección directa de *E. ruminantium* en la sangre solo es fiable durante y alrededor de la fase febril de la enfermedad. Los métodos basados en la PCR parecen ser más fiables para detectar la infección en garrapatas, y esto podría tener cierto valor epidemiológico para determinar la distribución geográfica de *Ehrlichia*. Además, cuando es necesario en áreas endémicas, la inclusión de garrapatas de prueba (originalmente sin infectar) alimentadas sobre un animal sospechoso mejoraría la sensibilidad de la detección de portadores cuando han fallado la serología y la PCR con sangre. Sin embargo, este procedimiento no es conveniente para laboratorios de diagnóstico rutinario ya que requiere el mantenimiento de colonias de garrapatas y la capacidad para infectar animales experimentalmente.

3. Pruebas serológicas

Se han descrito varias pruebas serológicas para diagnosticar cowdriosis: una prueba IFI con cultivo de células endoteliales infectadas de *E. ruminantium* como antígeno (prueba CIFA), ELISA indirecto, un ELISA competitivo (C-ELISA), y una inmunotransferencia (Western blot). La prueba IFI que utiliza macrófagos del peritoneo de ratón infectado con *E. ruminantium* (MIFA) se utiliza raramente en la actualidad.

Un inconveniente de todas estas pruebas es la detección de reacciones positivas falsas debido a determinantes antigénicos comunes entre *E. ruminantium* MAP1 y la presencia de proteínas similares en varias especies de *Ehrlichia*. Casi todas estas pruebas ya no se usan para epidemiología o diagnóstico. La prueba CIFA se usa aún en algunos lugares, pero hay que tener cuidado cuando se interpretan los resultados por el problema de las reacciones positivas falsas.

Para superar el problema de las reacciones cruzadas con *Ehrlichia*, se han desarrollado dos ELISAs sobre un antígeno MAP1 recombinante. El primero es un ELISA indirecto que utiliza una región inmunogénica de la proteína MAP1 (llamada MAP1-B) y produce muchas menos reacciones cruzadas con *Ehrlichia spp.* (ELISA con MAP1-B) (28). El segundo es un ELISA competitivo que utiliza el gen MAP-1 clonado en un baculovirus y anticuerpos monoclonales (MAbs) producidos contra la proteína MAP1 (C-ELISA con MAP1) (10). Ambas pruebas han mejorado la especificidad notablemente, pero aún muestran alguna reactividad con sueros de título alto contra *E. canis*, *E. chaffeensis* y un agente no clasificado del ciervo de cola blanca.

Hasta ahora, el ELISA con MAP 1-B ha sido el de utilización más amplia y se describirá con más detalles.

a) **Prueba de inmunofluorescencia indirecta con cultivo de tejido celular endotelial como antígeno (prueba CIFA) (17)**

Para preparar el antígeno, se cultiva una cepa de *E. ruminantium* en cultivos de células endoteliales de rumiantes. Cuando la mayoría de las células se lisan, se recogen las células adherentes restantes y se

mezclan con el sobrenadante. Las células se centrifugan tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 200 **g** durante 10 minutos. En cada pocillo de un porta para inmunofluorescencia se colocan 10 μ l de la suspensión celular lavada. Los portas con antígeno se secan, se fijan en acetona y se almacenan a -20°C.

• **Procedimiento de la prueba**

- i) Los sueros problema se diluyen 1/20 en PBS, se añaden a los pocillos con antígeno y se incuban durante 30 minutos en una cámara húmeda a 37°C.
- ii) Se lavan las placas en tampón durante 15 minutos.
- iii) Para cubrir los pocillos se añaden los conjugados anti-especies apropiados, diluidos generalmente 1/60. Las portas se incuban de nuevo durante 30 minutos a 37°C.
- iv) Después de un segundo lavado, los portas se ponen en glicerina tamponada bajo un cubre y se examinan con un microscopio de fluorescencia.
- v) Se incluyen sueros control positivos y negativos en cada porta.

b) Prueba de inmunofluorescencia indirecta con macrófagos del peritoneo de ratón infectado como antígeno (prueba MIFA) (8)

Se inyectan intraperitonealmente ratones con 0,2 ml de estabilizado de la cepa de Kumm después de recuperarlo del almacenamiento en nitrógeno líquido. Los síntomas clínicos – pelo erizado y aletargamiento- aparecen 12 días después, y pueden morir varios ratones. Los ratones supervivientes son sacrificados. Las células peritoneales que contienen algunos macrófagos con colonias de mórulas se extraen inyectando 2 ml de PBS en la cavidad peritoneal y recuperando el líquido. El líquido peritoneal recuperado se centrifuga durante 5 minutos a 2.000 **g** y el precipitado se resuspende en 0,3 ml de tampón.

Se coloca una gotita de la suspensión de células en cada pocillo de un porta para inmunofluorescencia para formar una monocapa de células. Las placas con antígeno se secan al aire, se envuelven en tejido y papel de estaño y se almacenan a 4°C durante 21 días, a -18°C durante 6-9 meses, o por debajo de -70° durante más de 1 año.

Inmediatamente antes de utilizarlas, los portas con antígeno se sumergen en metanol frío durante 1-3 segundos. Se utiliza un instrumento para separar los pocillos a fin de evitar la confluencia de suero entre los pocillos.

El procedimiento IFI es el mismo que en la prueba anterior, pero la dilución inicial del suero es 1/80.

c) Enzimoimmunoensayo con MAP1-B (28)

Utilizando el vector pQE9, el fragmento de PCR MAP1-F2R2, que codifica los aminoácidos 47-152 de la proteína MAP1 que incluye la región inmunogénica MAP1-B, se expresa en *Escherichia coli* M15[pREP4] como una proteína de fusión que contiene seis residuos adicionales de histidina. La MAP1-B recombinante se purifica utilizando Ni²⁺-NTA agarosa (ácido nitrilotriacético-agarosa) bajo condiciones desnaturizantes como lo describe el fabricante¹. El antígeno se conserva a 4°C y se titula cada lote.

El antígeno se diluye a 0,5 μ g/ml en tampón carbonato sódico 0,05 M, pH 9,6, y se inmoviliza sobre placas de poliestireno mediante incubación durante 1 hora a 37°C, y se guarda a 4°C hasta su uso.

• **Procedimiento de la prueba**

- i) Las placas se bloquean durante 30 minutos añadiendo 100 μ l por pocillo de PBS 0,1M, pH 7,2, suplementado con Tween 20 al 0,1% y leche desnatada seca al 3% (PBSTM).
- ii) Se lavan las placas tres veces con PBS suplementado con Tween 20 al 0,1 % (PBST) y dos veces con agua destilada.
- iii) Se añaden en pocillos duplicados 100 μ l de suero de la prueba diluidos al 1/100 en PBSTM, y se incuba durante 1 hora a 37°C.
- iv) Se lavan las placas tres veces en PBST y dos veces en agua destilada
- v) Se añaden 100 μ l por pocillo de IgG anti-especie conjugada con peroxidasa de rábano diluida óptimamente y la placa se incuba durante 1 hora a 37°C.

¹ Qiagen, Max-Volmer-Strasse 4, 40724 Hilden, Alemania.

- vi) Después de lavar como en el paso iv, cada pocillo se llena con 100 µl con tampón citrato 0,1M, pH 5,5, que contiene 0,5 mg/ml de ortofenilén-diamina y 3 µl/ml de 9% de H₂O₂.
- vii) La reacción se para después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente añadiendo 50 µl de H₂SO₄ 2N. La absorbancia se lee a 495 nm. Se incluyen controles positivos y negativos en cada placa.

d) Enzimoimmunoensayo competitivo con MAP1 (20)

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

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

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

• **Procedimiento de la prueba**

- i) Antes de su utilización, las placas se bloquean durante 30 minutos añadiendo 100 µl por pocillo de PBS, pH 7,2, suplementado con 0,05% de Tween 20 y 5% de leche seca desnatada.
- ii) Las placas se lavan tres veces con PBS/Tween, se añaden 50 µl/pocillo de suero problema diluido 1/50 en PBS suplementado con 0,05% de Tween 20 y 1% de leche seca desnatada (PBSTM) por duplicado y las placas se incuban durante 30 minutos a 37°C.
- iii) Sin ningún paso intermedio, se añaden 75 µl /pocillo de MAb diluido 1/4.000 (v/v) en PBSTM y se incuban las placas durante otros 30 minutos a 37°C.
- iv) Se lavan las placas tres veces en PBS/Tween y se añaden 50 µl por pocillo de IgG anti- ratón conjugada con peroxidasa de rábano diluida de forma óptima en PBSTM. La placa se incuba durante 1 hora a 37°C.
- v) Después de tres lavados como se describió anteriormente, se añaden a cada pocillo 100 µl de tampón citrato 0,1 M, pH 5,5, que contienen 0,5 mg/ml de O-fenilén diamina y 3 µl/ml de 9% de H₂O₂. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, se detiene la reacción añadiendo 50 µl de H₂SO₄ 2 N y se lee la absorbancia a 495 nm. En cada placa se incluyen controles positivos y negativos.

• **Lectura de resultados**

Todas las pruebas serológicas basadas en antígenos de *Ehrlichia* no recombinantes, tales como CIFA, ELISAs e inmunotransferencia, se utilizan aún para estudios experimentales, pero no para estudios sero-epidemiológicos. Las pruebas se han comparado y aplicado a sueros positivos y negativos conocidos para *E. ruminantium* (7). No se observaron reacciones positivas falsas en ninguna de las pruebas con sueros negativos conocidos. Existe una buena correlación entre las pruebas, pero la especificidad de las cinco pruebas es baja porque se producen reacciones cruzadas con algunas *Ehrlichia* spp.

La interpretación de los resultados de varias pruebas aplicadas a estudios de campo es, por tanto, difícil en áreas donde se producen infecciones por *Ehrlichia* en rumiantes, que es probablemente el caso en la mayoría de las regiones de Africa donde la cowdriosis es endémica. Esta situación también se ha visto en granjas sin *Amblyomma* pero infectadas con especies de garrapatas que no se ha demostrado que sean vectores de *E. ruminantium*.

Tanto el ELISA con MAP1-B como el C-ELISA con MAP1 han mostrado una gran especificidad después de su evaluación en el suero de 3000 rumiantes (cabra, oveja y ganado vacuno) recogidos de 14 islas de las Antillas Menores infectadas con *A. variegatum*, de las que solamente tres se sabe que están infectadas por *E. ruminantium* (20). La especificidad total calculada de las 11 islas sin cowdriosis fue 98,5% y 99,4% para el C-ELISA con MAP1 y el ELISA con MAP1-B, respectivamente. Aunque aún se encuentran unos cuantos sueros positivos falsos, es probable que estas pruebas resuelvan muchos de los problemas de especificidad de las anteriores pruebas serológicas.

La evaluación de la sensibilidad de las pruebas es más problemática ya que requiere el conocimiento de la situación exacta de un número alto de animales muestreados en el campo. Como se mencionó

anteriormente, en la actualidad no hay ninguna técnica sencilla disponible para confirmar si un animal está infectado. Desde el punto de vista experimental, se describió que la sensibilidad de C-ELISA en cabras era de 91,6-95,4% para el ELISA con MAP1-B, y de 96,3-96,9% para el C-ELISA con MAP1 (20). Sin embargo, en otro estudio la sensibilidad media era de 95% para valores de corte establecidos al 31% y 26,6% del suero control positivo para sueros de ovejas y cabras, respectivamente (19). De hecho, los cálculos se basan en un número limitado de animales inoculados experimentalmente en un periodo de tiempo inmediatamente después de la inoculación, cuando casi todos los animales son aún positivos. La sensibilidad en el ganado vacuno es incluso más baja y hay varios informes que demuestran que, después de la infección, la mayoría de los animales se convierten de nuevo en seronegativos en menos de 6 meses y algunos animales incluso nunca presentan seroconversión. Esta observación coincide con la diferencia en la prevalencia de anticuerpos observada entre rumiantes pequeños y ganado vacuno en inspecciones epidemiológicas que no se pueden explicar por un menor riesgo de infección de los últimos. Por ejemplo, en las granjas de Zimbabwe situadas en áreas endémicas, más del 90% de las cabras presentaban anticuerpos en su suero en comparación con el 33% del ganado vacuno mantenido en las mismas condiciones (14). Se han hecho observaciones similares en el Caribe.

Las pruebas serológicas son útiles para la evaluación de la infección de cowdriosis en animales vacunados. Las pruebas se pueden utilizar también para analizar animales antes de su importación a áreas libres de cowdriosis, teniendo en cuenta que los anticuerpos se mantienen a niveles detectables en rumiantes domésticos infectados naturalmente durante sólo unos pocos meses, y que los anticuerpos circulantes desaparecen más rápidamente en ganado vacuno que en rumiantes pequeños. Por tanto, es posible que los animales que dan negativo en las pruebas serológicas puedan ser portadores de infección. La serología debería considerarse, por tanto, como un método de diagnóstico aplicable a nivel de manada, no a nivel individual.

Los métodos moleculares, tales como pruebas de PCR, podrían ayudar potencialmente a detectar animales portadores sin anticuerpos detectables, pero esta posibilidad presenta aún inconvenientes importantes (ver sección B.2. Métodos moleculares).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

Aunque se han obtenido resultados prometedores con organismos inactivados o atenuados, no existen actualmente vacunas comerciales. El único método de inmunización contra la cowdriosis es el método de "infección y tratamiento" utilizando sangre infectada o con homogenados de garrapatas infectadas pre alimentadas seguido por tratamiento de los animales infectados con tetraciclina. Este método se usa aún en varias zonas. Sin embargo, es probable que sea reemplazado pronto por la vacunación con preparados de cuerpos elementales de *E. ruminantium* inactivados emulsionados en adyuvantes lipídicos, después de la demostración de que las cabras susceptibles pueden protegerse con *Ehrlichia* inactivada en adyuvante de Freund (16). Esta vacuna también protegía contra inoculación de desafío en ovejas (11) utilizando diferentes cepas de *E. ruminantium*, y en ganado vacuno (27) utilizando la misma cepa que en cabras. Se ha demostrado que una preparación de vacunas de primera generación de *Ehrlichia* inactivada en adyuvante lipídico Montanide ISA 50 (adyuvante autorizado para uso en animales) era tan efectiva como la preparación con adyuvante de Freund en inoculaciones experimentales de laboratorio en cabras inmunizadas.

Los animales se pueden inmunizar con dos inyecciones subcutáneas de 250 µg de antígeno emulsionado (50/50) en adyuvante Montanide ISA 50 en un volumen de 2 ml. En la actualidad se están llevando a cabo estudios adicionales sobre la optimización de producción de vacunas, control de calidad y eficacia en las diferentes especies a las que van dirigidas. En condiciones experimentales, se ha demostrado en cabras que la dosis de vacuna puede bajarse hasta 32 µg del antígeno sin disminuir el efecto de protección.

La evaluación de una vacuna inactivada con adyuvante ISA 50 ha puesto de manifiesto que protege a las ovejas contra la exposición natural en Zimbabwe (12). Además, se están llevando a cabo en la actualidad muchos intentos de evaluación en condiciones de campo en varias granjas de África. Un desafío importante es la caracterización de la amplitud de la diversidad de cepas en una región que va a ser cubierta por una vacuna adecuada. Este conocimiento resultará esencial para la generación de nuevas vacunas que se desarrollen en el futuro.

REFERENCIAS

1. ALLSOPP M.T.E.P., HATTINGH C.M., VOGEL S.W. & ALLSOPP B.A. (1999). Evaluation of 16S, *map1* and pCS20 probes for detection of *Cowdria* and *Ehrlichia* species. *Epidemiol. Infect.*, **122**, 323-328.

2. BEKKER C.P., DE VOS S., TAOUFIK A., SPARAGANO O.A. & JONGEJAN F. (2002). Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. *Vet. Microbiol.*, **89**, 223–238.
3. BEZUIDENHOUT J.D., PROZESKY L., DU PLESSIS J.L. & VAN AMSTEL S.R. (1994). Capítulo 35: Heartwater. *En: Infectious Diseases of Livestock, with special reference to Southern Africa*, Coetzer J.A.W., Thomson G.R., Tustin R.C. & Kriek N.P.J., eds. Oxford University Press, Oxford, UK, Vol. 1, 351–370.
4. CAMUS E. & BARRE N. (1988). Le diagnostic de la cowdriose à partir d'écrasement de cerveau. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **41**, 247–252.
5. CAMUS E., BARRE N., MARTINEZ D. & UILENBERG G. (1996). Heartwater (cowdriosis). A Review, Second Edition. Office International des Epizooties, Paris, France, pp. 177.
6. 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 six 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.
7. DU PLESSIS J.L., BEZUIDENHOUT J.D., BRETT M.S., CAMUS E., JONGEJAN F., MAHAN S.M. & MARTINEZ D. (1993). The serodiagnosis of heartwater: a comparison of five tests. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **46**, 123–129.
8. DU PLESSIS J.L. & MALAN L. (1987). The application of the indirect fluorescent antibody test in research on heartwater. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **54**, 319–325.
9. JONGEJAN F. & THIELEMANS J.C. (1989). Identification of an immunodominant antigenically conserved 32-kilodalton protein from *Cowdria ruminantium*. *Infect. Immun.*, **57**, 3243–3246.
10. KATZ J.B., DEWALD R., DAWSON J.E., CAMUS E., MARTINEZ D. & MONDRY R. (1997). Development and evaluation of a recombinant antigen, monoclonal antibody-based competitive ELISA for heartwater serodiagnosis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 130–135.
11. MAHAN S.M., ANDREW H.R., N. TEBELE, BURRIDGE M.J. & BARBET A. (1995). Immunisation of sheep against heartwater with inactivated *Cowdria ruminantium*. *Res. Vet. Sci.*, **58**, 46–49.
12. MAHAN S.M., KUMBULA D., BURRIDGE M.J. & BARBET A.F. (1998). The inactivated *Cowdria ruminantium* vaccine for heartwater protects against heterologous strains and against laboratory and field tick challenge. *Vaccine*, **16**, 1203–1211.
13. MAHAN S.M., PETER T.F., SIMBI B.H. & BURRIDGE M.J. (1998). PCR detection of *Cowdria ruminantium* infection in ticks and animals from heartwater-endemic regions of zimbabwe. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **849**, 85–87.
14. MAHAN S.M., SEMU S.M., PETER T.F. & JONGEJAN F. (1998). Evaluation of the MAP1-B ELISA for cowdriosis with field sera from livestock in Zimbabwe. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **849**, 259–261.
15. MAHAN S.M., WAGHELA S.D., MCGUIRE T.C., RURANGIRWA F.R., WASSINK L.A. & BARBET A.F. (1992). A cloned DNA probe for *Cowdria ruminantium* hybridizes with eight heartwater strains and detects infected sheep. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 981–986.
16. MARTINEZ D., MAILLARD J.C., COISNE S., SHEIKBOUDOU C & BENSALD A. (1994). Protection of goats against heartwater acquired by immunisation with inactivated elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **41**, 153–163.
17. MARTINEZ D., SWINKELS J., CAMUS E. & JONGEJAN F. (1990). Comparaison de trois antigènes pour le sérodiagnostic de la cowdriose par immunofluorescence indirecte. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **43**, 159–166.
18. MARTINEZ D., VACHIERY N., STACHURSKI F., GUEYE A., KANDASSAMY Y., RALINIAINA M. & APRELON R. (2004). Nested-PCR for detection and genotyping of *Ehrlichia ruminantium*. Use in genetic diversity analysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, (En prensa).
19. MBOLOI M.M., BEKKER C.P.J., KRUITWAGEN C., GREINER M. & JONGEJAN F. (1999). Validation of the indirect MAP1-B Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of experimental *Cowdria ruminantium* infection in small ruminants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 66–72.

20. MONDRY R., MARTINEZ D., CAMUS E., LIEBISCH A., KATZ J.B., DEWALD R., VAN VLIET A.H.M. & JONGEJAN F. (1998). Validation and comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to *Cowdria ruminantium* infection. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **849**, 262–272.
21. PERREAU P., MOREL P.C., BARRE N. & DURAND P. (1980). Existence de la cowdriose (heartwater) à *Cowdria ruminantium* chez les ruminants des Antilles françaises (La Guadeloupe) et des Mascareignes (La Réunion et Ile Maurice). *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **33**, 21–22.
22. PETER T.F., BARBET A.F., ALLEMAN A.R., SIMBI B.H., BURRIDGE M.J. & MAHAN S.M. (2000). Detection of the agent of heartwater, *Cowdria ruminantium*, in *Amblyomma* ticks by PCR: validation and application of the assay to field ticks. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 1539–1544
23. PETER T.F., BURRIDGE M.J. & MAHAN S.M. (2002). *Ehrlichia ruminantium* infection (heartwater) in wild animals. *Trends Parasitol.*, **18**, 214–218.
24. PETER T.F., DEEM S.L., BARBET A.F., NORVAL R.A.I., SIMBI B.H., KELLY P.J. & MAHAN S.M. (1995). Development and evaluation of PCR assay for detection of low levels of *Cowdria ruminantium* infection in *Amblyomma* ticks not detected by DNA probe. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 166–172.
25. PIENAAR J.G. (1970). Electron microscopy of *Cowdria (Rickettsia) ruminantium* (Cowdry, 1926) in the endothelial cells of the vertebrate host. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **37**, 67–78.
26. SCHREUDER B.E.C. (1980). A simple technique for the collection of brain samples for the diagnosis of heartwater. *Trop. Anim. Health Prod.*, **12**, 25–29.
27. TOTTE P., MCKEEVER D., MARTINEZ D. & BENSALD D. (1997). Analysis of T-cell responses in cattle immunised against heartwater by vaccination with killed elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. *Infect. Immun.*, **65**, 236–241.
28. VAN VLIET A.H.M., VAN DER ZEIJST B.A.M., CAMUS E., MAHAN S.M., MARTINEZ D. & JONGEJAN F. (1995). Use of a specific immunogenic region on the *Cowdria ruminantium* MAP1 protein in a serological assay. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 2405–2410.
29. WAGHELA S.D., RURANGIRWA F.R., MAHAN S.M., YUNKER C.E., CRAWFORD T.B., BARBET A.F., BURRIDGE M.J. & MCGUIRE T.C. (1991). A cloned DNA probe identifies *Cowdria ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2571–2577.

*

* *

NB: Existe un laboratorio de referencia de la OIE para Cowdriosis (ver Cuadro en la Parte 3 de este *Manual de animales terrestres* o consulte el sitio Web de la OIE para una lista más actualizada: www.oie.int).