



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT	2
1.1. Resumen	2
1.2. Abstract	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. Género <i>Anaplasma</i>	4
2.2. Anaplasmosis ovina	4
2.3. Distribución y situación actual a nivel global	5
2.4. Patogénesis	6
2.5. Métodos de diagnóstico	8
2.6. Tratamiento y prevención	9
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	10
4. METODOLOGÍA	11
4.1. Diseño del estudio	11
4.2. Animales estudiados	13
4.3 Examen clínico y evaluación de garrapatas	15
4.4. Análisis biomoleculares	17
4.5 Análisis estadístico	18
5. RESULTADOS	18
5.1. Prevalencia inicial	18
5.2. Clasificación taxonómica de las garrapatas	19
5.3. Examen clínico y evaluación de la presencia de garrapatas	19
5.4. Análisis moleculares	20
6. DISCUSIÓN	23
7. CONCLUSIONES	26
7.1. Conclusiones	26
7.2. Conclusions	27
8. VALORACIÓN PERSONAL	28
9. BIBLIOGRAFÍA	29

1. RESUMEN/ABSTRACT

1.1. Resumen

La Anaplasmosis ovina es una enfermedad emergente en Europa, más aún en España como consecuencia de la especial sensibilidad de los ecosistemas mediterráneos al cambio climático, produciendo pérdidas importantes en los rebaños afectados. El primer caso descrito en España fue en el Matarraña (Teruel) y a partir de entonces numerosos casos han sido diagnosticados en Aragón y España.

El agente causante de la enfermedad es una bacteria llamada *Anaplasma ovis*, un agente intraeritrocitario obligado que se transmite principalmente a través de las garrapatas. Los signos clínicos de dicha enfermedad se caracterizan por una marcada anemia en adultos acompañada de adelgazamiento crónico, lo que supone importantes pérdidas económicas a las ganaderías implicadas, siendo especialmente sensibles los animales en torno al primer parto y tras situaciones graves de estrés.

Las medidas de prevención de la Anaplasmosis se basan en el control de las garrapatas, por ello es necesario conocer qué productos son efectivos y en qué medida funcionan a la hora de evitar la picadura de la garrapata.

En el presente estudio se han puesto a prueba dos tipos de insecticidas de la familia de los piretroides; deltametrina y cipermetrina. Los ensayos se han llevado a cabo en dos rebaños diferentes ubicados ambos en la provincia de Huesca, uno en Apiés y otro en Beleder (Campo), en los que se valoró la eficacia de estos productos en sucesivas visitas tras su aplicación, valorando tanto la presencia de garrapatas como los animales parasitados, así como la evolución en el número de animales positivos mediante pruebas moleculares en ambas explotaciones.

1.2. Abstract

Ovine Anaplasmosis is an emerging disease in Europe, even more in Spain, due to the particular sensitivity of Mediterranean ecosystems to climate change, resulting in severe losses in affected flocks. The first case described in Spain was in Matarraña (Teruel), and since then, numerous cases have been diagnosed in Aragón and Spain.

The causative agent of the disease is a bacterium called *Anaplasma ovis*, an obligated intraerythrocytic agent which is transmitted mainly through ticks. The clinical signs associated with this disease are characterized by severe anaemia in adults accompanied by chronic emaciation, resulting in important economic losses on affected farms, being particularly sensitive those animals around first parturition and after serious stressful situations.

Preventive measures of Anaplasmosis are based on tick control, so it is essential to know which products are effective in preventing tick bites.

In the present study there have been tested two types of insecticides, both from the pyrethroid family; deltamethrin and cypermethrin. The trials were conducted in two different flocks, both located in the province of Huesca, one in Apiés and another in Beleder (Campo), In which was valued the effectiveness of these products in successive visits after its application, taking care as much as tick presence as positive animals through molecular tests in both farms.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Género *Anaplasma*

Actualmente, tras la última clasificación han sido descritas varias especies del género *Anaplasma* afectando a rumiantes, tales como *A. marginale*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. caudatum*, *A. capra*, *A. ovis*, así como el conocido agente zoonótico *A. phagocytophylum* (Dumler et al., 2001). Una característica relevante de las bacterias del género *Anaplasma* es que tienen tropismo por células sanguíneas. *Anaplasma phagocytophilum*, por ejemplo, tiene tropismo por los neutrófilos y, además del ovino donde produce la fiebre por garrapatas (tick-borne fever), puede afectar al hombre causando la anaplasmosis granulocítica humana (Quinn et al. 2011). Por otro lado, *A. bovis* afecta a monocitos mientras que otras especies como *A. ovis*, *A. capra*, *A. marginale* y *A. centrale* tienen tropismo por los eritrocitos (Dumler et al., 2001). Algo comúnmente aceptado es que su transmisión principal es a través de garrapatas de varias especies las cuales son consideradas su vector biológico (Uilenberg 1997; Kocan et al., 2004) Sin embargo, otras posibles vías de transmisión mecánica han sido descritas, bien por vectores o a través de fómites. (Mason et al., 2017).

2.2 Anaplasmosis ovina

La anaplasmosis ovina está producida por *Anaplasma ovis*, una bacteria Gram-negativa intraeritrocitaria obligada, perteneciente a la familia Anaplasmataceae. Esta bacteria es principalmente transmitida por garrapatas de la familia Ixodidae (Jiménez et al., 2015), también conocidas comúnmente como garrapatas duras porque presentan una gran placa esclerotizada en la superficie dorsal (Estrada-Peña, 2015 b). Sin embargo, se han descrito otros tipos de transmisión a través de vectores, como pulgas, hipoboscidos o tábanos, e incluso también se ha descrito la transmisión vía iatrogénica a través de agujas u otro tipo de material veterinario (Kocan et al., 2004; Mason et al., 2017, Zhao et al., 2018).

Así pues, se considera que es la transmisión por garrapatas de la familia Ixodidae el mecanismo más eficaz de transferencia de la bacteria puesto que las bacterias del género *Anaplasma* son capaces de replicarse activamente en el interior de las garrapatas, en sus glándulas salivares, incrementándose de esta manera su carga bacteriana y facilitando la transmisión de la bacteria a nuevos hospedadores mediante su picadura, motivo por el cual se considera su vector biológico (Kocan et al., 2004; Brayton, 2012). Dentro de esta familia se incluyen algunos de los géneros más conocidos, como *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* y *Amblyomma* (Rymaszewska et al., 2008). La capacidad de infección depende de la dosis inoculada siendo necesaria una dosis mínima. Brayton demostró que

en otras especies de *Anaplasma*, la garrapata tiene capacidad infectiva cuando se alcanzan concentraciones de 10^6 microorganismos en sus glándulas salivares. Sin embargo, también se planteó que un elevado número de garrapatas pueden permitir la transmisión de cepas de baja eficiencia, del mismo modo que esa parasitación masiva en un individuo incrementará la dosis inoculada. Por ello, la mayor presencia de vectores, bien sean biológicos o mecánicos, podría mejorar la eficacia en la transmisión de la bacteria (Brayton, 2012).

2.3. Distribución y situación actual a nivel global

La anaplasmosis ovina es un proceso típico de países tropicales y subtropicales donde produce, en animales jóvenes, cuadros de moderada o leve gravedad al ser zonas endémicas. Sin embargo, la enfermedad ha sido diagnosticada durante los últimos años en zonas donde no se conocía, como EEUU, muchos países de la cuenca mediterránea europea y africana, así como en países más al norte como Hungría, Alemania e incluso China (Renneker et al., 2013; Stuen, 2016; Jiménez et al., 2015, Yang et al., 2018, Bauer, 2021). El primer caso descrito en ganado ovino en España fue en el 2014 (Lacasta et al., 2021), aunque ya se conocían casos en rumiantes salvajes (De la Fuente et al., 2008). El brote tuvo lugar en la Comarca del Matarraña, Teruel, donde desde el año 2010 se venían observando animales afectados con signos clínicos insuficientes para llegar a un diagnóstico certero. Se trató de un brote grave en el que los animales presentaban un cuadro inespecífico de debilidad, anorexia, pérdida de peso, etc., que conducía a una caquexia evidente en los animales afectados que conllevaba al desecho de los animales o incluso a su muerte en la explotación (Lorenzo et al., 2016). En ocasiones también se observaron otros síntomas como cojeras, lesiones orales leves e hipertermia, epífora, etc., signos clínicos todos ellos bastante inespecíficos. En el 2014 sin embargo la situación empeoró severamente, momento en el cual tres animales afectados fueron remitidos al Servicio Clínico de Rumiantes del Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza. Los principales afectados fueron los adultos jóvenes, especialmente las ovejas en torno al primer parto. Según Jiménez et al. en 2015 los animales se infectan cuando salen a apacentar, es decir, la infección se asocia principalmente al pastoreo.

El principal vector de la anaplasmosis ovina son las garrapatas y estas habitan en zonas de pastoreo y de paso, por lo que en el momento en que las ovejas salen a pastar son susceptibles de entrar en contacto con el vector, ser mordidas e infectarse. La época de mayor prevalencia es el final de la primavera y el principio del verano ya que los climas cálidos y húmedos favorecen la proliferación de garrapatas (Pfaffle et al., 2013; Matei et al., 2019).

Anaplasma ovis está ampliamente distribuida en toda la cuenca del Mediterráneo (Stuen, 2016), siendo sus descripciones más al norte de Europa en Hungría (Hornok et al., 2007) y Alemania (Bauer et al., 2021). En los países nórdicos no se ha descrito esta especie de *Anaplasma*, si bien *A. phagocitophilum* sí se halla en dichas localizaciones (Stuen et al., 2005). Esta distribución de la enfermedad puede ser debida al área de distribución del vector, puesto que *Ixodes ricinus* se considera vector principal de *A. phagocitophilum*, siendo una garrapata de climas fríos, mientras que *A. ovis*, se ha descrito más en garrapatas de climas cálidos como *R. bursa*, *R. turanicus*, *R. sanguineus* y *Dermacentor* (Estrada-Peña et al., 2013; Porretta et al., 2013; Cunze et al., 2022; Noll et al., 2023)

Por otro lado, el papel de los ungulados silvestres como reservorio de las especies de *Anaplasma* se considera fundamental en su transmisión (Diaz-Cao et al., 2022). En España, *A. ovis* se ha diagnosticado en corzo (*Capreolus capreolus*) en Andalucía, con una prevalencia del 82% de los animales muestreados mediante PCR (De la Fuente et al., 2008). Otro factor fundamental de la transmisión, es que *A. ovis* es capaz de mantenerse activo durante toda la vida del animal una vez el ovino ha sido infectado, siendo detectable hasta 6 años post-infección (Ruiz et al., 2023). Por ello, el papel de los animales que sobreviven a la enfermedad es clave, puesto que una vez un animal es infectado, ya sea doméstico o salvaje, puede actuar como reservorio de la enfermedad, siendo la fuente de futuras infecciones (Jiménez et al., 2019; Ruiz et al., 2023). Más aún cuando la garrapata implicada en el ciclo de transmisión sea de 3 hospedadores, como es el caso de *Rhipicephalus* (Estrada-Peña, 2015b). Por ello, si la garrapata se infecta en estadio inmaduro al morder un individuo infectado, puede ser capaz de transmitir la infección en siguientes momentos al infectar otros potenciales hospedadores.

2.4. Patogénesis

Anaplasma ovis infecta los eritrocitos de los pequeños rumiantes siendo el causante de la anaplasmosis ovina, pero es la especie de *anaplasma* menos estudiada, debido a que afecta al ovino, que es una especie de bajo valor económico.

Una vez ha sido inoculada la bacteria bien mediante garrapatas u otras posibles vías de transmisión mecánica en un ovino, la bacteria, al ser un agente intraeritrocitario obligado, comienza a replicarse en el interior de los eritrocitos mediante fisión binaria para formar hasta ocho organismos individuales (Ristic y Watrach, 1963; Palmer y McGuire, 1984; Ristic y Kreier, 1984). Durante la fase aguda de la infección, el número de eritrocitos infectados es capaz de duplicarse cada 24-48 horas (REF). Tras esto, mediante mecanismos no líticos desconocidos, es capaz de producir la destrucción de los glóbulos rojos afectados, probablemente en un mecanismo influenciado por la respuesta

inmune del propio animal (OIE art., 2012; Bautista, 1996). Esto deriva en una anemia que no se manifiesta hasta los 30-40 días tras la infección, momento en que la destrucción del número de eritrocitos ya es importante. Por ello, es un proceso crónico cuyo síntoma principal es la anemia de carácter regenerativo en sus primeras fases, asociada a procesos inespecíficos, como pérdida de peso progresiva o disminución de la producción (Bautista, 1996; Kocan et al., 2010; Yasini et al., 2012). El estado de salud se agrava en torno al momento del parto y se han llegado a describir incluso abortos, si bien fueron asociados más a la propia debilidad que genera en el animal que a la propia infección (Bautista 1996; Yasini et al., 2012; Renneker et al., 2013).

Tras la infección por anaplasma, los animales muestran un pico de anemia entre los días 8 y 12, que se restablece a valores normales y continúa con un segundo pico, más severo, alrededor del día 30 post-infección, que se prolonga de 15 a 30 días (Jiménez et al., 2015). Pero analizando la presencia de la bacteria en sangre, es posible encontrarla ya incluso a los 4-7 días post-infección mediante pruebas moleculares tipo PCR (Brown et al. 1998, Ciani et al., 2013).

A partir de entonces, según Jiménez et al. (2015), los animales sufren un incremento progresivo hasta alcanzar el pico de bacteriemia entre los 30-37 días. La severa anemia hemolítica asociada a esta enfermedad se considera que es debida a la propia respuesta inmune que provoca anaplasma en el organismo. Esta respuesta es tanto de tipo celular como humoral. En un principio, los linfocitos T CD4+ producen interferón gamma (IFN- γ), que es el encargado de activar la respuesta inmune producida por las IgG2 coordinadas con macrófagos activados. Las IgG2 provocan la opsonización de los eritrocitos uniéndose a epítopos de las proteínas de membrana de la bacteria expresados en el eritrocito infectado. A su vez, la lisis de estos eritrocitos se debe a la activación de los macrófagos que producen óxido nítrico (Brown et al., 1998).

Tras estos episodios el animal queda infectado de forma persistente (Suárez et al., 2011, Ruiz et al., 2023). El hecho de que se repitan dichos ataques a los eritrocitos por los macrófagos es porque los antígenos de superficie de membrana de la bacteria cambian y hace que pasen a ser detectados de nuevo por el sistema inmune del hospedador, dando lugar a otro pico de hemólisis. Esta hemólisis deriva en una anemia severa de tipo normocítico normocrómico, que en ocasiones aparece acompañada por una monocitosis importante. Además, en el perfil bioquímico suele ir acompañado de valores elevados de AST (Aspartato aminotransferasa) y GGT (gamma-glutamil transferasa), enzimas asociadas a daño hepático, que pueden aparecer como consecuencia de que el hígado sufra daño al tener que detoxificar el exceso de grupos hemo derivados de la destrucción masiva de eritrocitos (Lacasta et al., 2020). Por el contrario, en las necropsias no suelen apreciarse hallazgos

relevantes, más allá de aquellos que se observan en enfermedades degenerativas crónicas como dilatación cardíaca, aplasia medular y atrofia serosa generalizada, que pueden ser observados igualmente en otras muchas enfermedades incluidas en el diferencial del síndrome de la oveja caquética.

2.5 Métodos de diagnóstico

Históricamente la técnica de diagnóstico más empleada era la extensión de sangre entera en forma de frotis y tinción con Giemsa al 10%, en el que se observaban al microscopio óptico las vacuolas en el interior de los eritrocitos. Con este método, se pueden llegar a detectar niveles de bacteriemia del 0,1-0,2% (Eriks et al., 1989). Para obtener la muestra de sangre para *Anaplasma* es necesario extraerla de la vena yugular, a diferencia de lo que ocurre con un patógeno similar como es *Babesia*, en el cual hay que extraer la sangre de los capilares. *Anaplasma* aparece como un corpúsculo denso y redondeado en el interior de los eritrocitos, con un diámetro aproximado de 0,3-0,1 μm . Según el estadio de infección y la severidad de esta, podemos ver variaciones en el porcentaje de eritrocitos infectados (OIE art., 2012, Bautista, 1996). Esta técnica, sin embargo, no es útil en casos de infección subclínica o crónica, puesto que no tiene sensibilidad suficiente (Trueblood y Palmer, 1998).

Las técnicas de diagnóstico indirecto son otra posibilidad, si bien se han limitado al uso de cELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción competitivo). Este test responde a la gran estabilidad de la proteína Msp5, presente en todas las especies de *Anaplasma*, lo que permite el uso del kit para diferentes especies. En un estudio realizado por Mason et al. en 2017 se testaron kits de *A. marginale* en casos de *A. ovis*, obteniendo buenos resultados. Sin embargo, esa es su gran debilidad, puesto que no es capaz de discernir entre especies de *Anaplasma* de forma específica, no permitiendo discernir si la enfermedad la están causando *A. marginale* o *A. ovis* (Hornok et al., 2007), por lo que habría que recurrir a técnicas moleculares de diagnóstico directo que sí permiten el diagnóstico específico.

Es por este motivo que actualmente el método diagnóstico por excelencia es la PCR, puesto que es capaz de detectar infecciones con un mínimo de 0,0001% de eritrocitos infectados. Además, es capaz de diferenciar y secuenciar la especie de *Anaplasma* presente (OIE art., 2012; Bautista, 1996). En un comienzo se propuso el gen *msp5* como determinante para el diagnóstico mediante las pruebas moleculares, ya que se representa con una sola copia en el genoma, altamente conservada en las cepas de *A. marginale* estudiadas (Martínez et al., 2004). Además, la presencia de este gen en todas las especies de anaplasma sugiere que es esencial en el ciclo de vida de la bacteria, lo que refuerza su uso para el desarrollo de procedimientos de diagnóstico molecular. (Visser et al., 1992). Sin embargo, actualmente se emplea el gen *msp4*, el cual es responsable de la expresión de una proteína mayor de

membrana utilizado para diferenciar entre las distintas especies de *Anaplasma* (de la Fuente et al., 2002). La PCR es una herramienta muy útil ya que su sensibilidad y especificidad son muy útiles para detectar la bacteria tanto en el animal como en el vector artrópodo, es decir, la garrapata. Gracias a esto, se pueden realizar estudios para conocer la prevalencia global de la enfermedad en el campo. (Stich et al., 1993). Otros métodos diagnósticos como fijación de complemento y aglutinación en tarjeta, son los métodos más usados para detectar animales infectados con *A. marginale* en el campo y han sido métodos aceptados para permitir el movimiento de animales a nivel internacional. (World Organization for Animal Health, 2000, Jiménez et al., 2015). Estos métodos son usados en bovino, pero no han sido desarrollados para *Anaplasma ovis* específicamente.

Las pruebas moleculares por lo tanto, han supuesto el avance definitivo para diferenciar especies, mediante el gen *msp4*.

2.6 Tratamiento y prevención

El tratamiento de la anaplasmosis ha variado a lo largo del tiempo, han sido empleados diferentes fármacos como el dipropionato de imidocarb y tetraciclinas, aunque también se ha descrito el uso de otros productos como los arsenicales, antimaláricos y derivados antimoniales, aunque resultando poco efectivos (Coetzee, 2006). En España, actualmente no hay ningún fármaco autorizado para el tratamiento de la anaplasmosis ovina. Sin embargo, para el tratamiento de la anaplasmosis bovina sí existen fármacos registrados, por lo que para usarlos en el ganado ovino se tendría que hacer una prescripción excepcional. En concreto, el dipropionato de imidocarb, comercializado como Hemocarb 85 mg/ml solución inyectable de S.P. Veterinaria y el Imizol de Merck Sharp & Dohme Animal Health S.P. En ambos, la aplicación es vía subcutánea, intramuscular o intravenosa a 2,1 mg/KG p.v. en dosis única. Además, la oxitetraciclina dihidrato, comercializado como Forticlina Retard 200 mg/ml de Laboratorios Syva S.A. en aplicación intramuscular a 20 mg/kg p.v. en dosis única. (CimaVet 2023).

En un estudio en el que se compararon dos antibióticos para controlar la anaplasmosis ovina en corderos, se demostró que tanto la doxiciclina inyectable intramuscular durante 7 días cada 24 horas, así como 3 aplicaciones de oxitetraciclina retardada inyectada intramuscularmente durante 6 días, parecían ser capaces de controlar la infección y sus consecuencias, pero no fueron capaces de curar por completo a los animales al no obtener resultados negativos mediante pruebas moleculares, permaneciendo como reservorios de la bacteria (Lacasta et al., 2022). Otros estudios han sugerido que el tratamiento con clortetraciclina puede ser eficaz también en el control de la enfermedad, previniendo la infección de nuevos eritrocitos (Reinbold et al., 2010). Sin embargo, ninguno de los 3 antibióticos, si bien mejoran la clínica, no consiguen la recuperación total del animal. Además, al ser

antibióticos, pueden generar resistencias, por lo que se deben tomar medidas preventivas y solo emplearlos en brotes concretos de la enfermedad.

Otros posibles tratamientos pueden ser utilizados como forma paliativa o de soporte en los animales una vez enfermos, pudiendo ayudar a la recuperación del animal, como por ejemplo el aporte de vitaminas y/o la fluidoterapia. Incluso la transfusión de sangre puede ser muy útil en la recuperación de los animales, siendo necesario disponer de un donante sano. Sin embargo, debido al escaso valor individual del ovino así como la dificultad de disponer de las condiciones ideales en el campo, es una opción raramente empleada. Otras medidas generales como un adecuado aporte nutricional y mineral, así como unas buenas instalaciones son fundamentales, para así dar tiempo al animal para ser capaz de regular su sistema inmune y combatir la enfermedad (Ruiz et al., 2023).

Al ser una enfermedad ligada al pastoreo, es un punto sobre el que incidir. Si bien, los sistemas de producción típicos de nuestro país en la actualidad, no puede controlar ni las salidas a pastar ni el clima, por lo que el control ha de centrarse en evitar el contacto entre el hospedador y el vector, es decir, entre la oveja y la garrapata. Los ganaderos pueden evitar campos donde haya gran número de garrapatas, pero como esto es complicado, una medida preventiva común es uso de productos antiparasitarios para la prevención de parasitación por garrapatas, incluso con efecto repelente, siendo una alternativa eficaz y económica para el control de la enfermedad. Existen varios productos registrados para su uso frente a garrapatas en ovino de distintas aplicaciones (inyectables y tópicos). Dos de los principios activos más usados son la deltametrina y la cipermetrina, los cuales pertenecen al grupo de los piretroides. (Ruiz et al. 2023).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La anaplasmosis cada vez tiene más importancia en Europa, especialmente en España- Esto es debido al aumento de las temperaturas que favorecen la presencia de los vectores en zonas en las que no se encontraban. Esto desencadena en pérdidas económicas de gran valor debido a los procesos que sufren los animales afectados, como puede ser la emaciación, descensos en la producción, mortalidad o presencia de canales ictéricas en el matadero que son decomisadas.

De manera frecuente los veterinarios y ganaderos del sector ovino, notifican brotes de anaplasma y pérdidas en los rebaños, debido a la ausencia de trabajos que reflejan medidas de prevención efectivas. Por ello, se necesita poner a prueba distintos métodos para así recoger datos y conocer qué medidas son más eficaces frente a la infección de *Anaplasma ovis*.

El objetivo de este trabajo es poner a prueba diferentes medidas de prevención frente al vector principal de *Anaplasma*, la garrapata, evitando así la infección de dicha bacteria. Este estudio se ha realizado en dos explotaciones de la provincia de Huesca.

Los objetivos específicos del estudio son:

1. Valorar la eficacia de 2 productos registrados para su aplicación en ovino frente a la parasitación por garrapatas en animales no infectados que pastoreen en zonas con conocimiento de casos de anaplasmosis ovina.
2. Determinar cuál o cuáles son las especies de garrapatas en la zona, y que, por lo tanto, pueden tener implicación en la transmisión de la enfermedad.
3. Conocer la prevalencia inicial de los lotes de reposición al comienzo de la época favorable para la actividad de las garrapatas, así como analizar posibles causas que puedan provocar variaciones entre rebaños.
4. Determinar posibles momentos clave en la proliferación del vector.

4. METODOLOGÍA

El presente estudio fue aprobado por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza el día 10 de febrero de 2021, con referencia PI06/21.

4.1 Diseño del estudio



Imágen 1. Ubicación de las explotaciones del estudio en el mapa de Aragón.

El estudio fue realizado de manera simultánea en dos explotaciones de la provincia de Huesca (Aragón) con un historial previo de casos de anaplasmosis ovina causada por *Anaplasma ovis*, diagnosticados en el Servicio Clínico de Rumiantes (SCRUM) de la Universidad de Zaragoza en los últimos años. Ambas explotaciones siguen un sistema de pastoreo de tipo semiintensivo, en el cual los animales son estabulados únicamente de forma previa al parto y durante parte de la lactación, según la disponibilidad de alimento en el campo. Debido a que la enfermedad sigue generando problemas en ambas explotaciones la necesidad de prevenirla se hace fundamental, para ello, un paso esencial es conocer la prevalencia de dicha patología en los lugares de estudio, y comprobar qué método de prevención es más adecuado y eficaz.

Explotación 1

La explotación 1, localizada en Apiés (42°13'30" N, 0°24'13" W), municipio ubicado en la Plana de Huesca, se trata de una explotación de 2000 ovejas de raza rasa aragonesa incluidas en el libro genealógico de ANGRA (Asociación Nacional de Criadores de Ganado Ovino Selecto de Raza Rasa Aragonesa). Lleva un sistema con 4 pariciones al año en los meses de marzo, junio, septiembre y diciembre de mes y medio cada una. La reposición, que supone cerca del 20% de tasa anual, la deja mayoritariamente de la parición de diciembre, unas 150, mientras que del resto de parideras deja unas 30 corderas por parición. La explotación sigue un manejo productivo de tipo semiintensivo, en el cual las madres son estabuladas la primera semana tras el parto junto con sus corderos y apoyadas con suplementación basada en heno y pienso compuesto. Pasados estos días, las madres pastorean zonas alrededor de la explotación durante el día para regresar a la tarde a la explotación, donde permanecen los corderos estabulados. El destete se realiza a los 45 días aproximadamente, salvo para las corderas de reposición que permanecen junto con las madres hasta los 3 meses de edad saliendo a pastorear por los campos cercanos.

La granja se encuentra a 680 metros sobre el nivel del mar, con una precipitación anual media de 801 mm³ repartida entre todos los meses del año y una temperatura media de 13,9°C. La zona de pastoreo está próxima a la Sierra de Guara, siendo un terreno de arcillas con afloramientos calizos. Los animales pastorean zonas de cultivo de cereales, leguminosas, almendros y vides, así como zonas de pasto comunal y barbechos.

Explotación 2

La explotación 2, se encuentra situada en Beleder, (42°25'19.31" N, 0°23'47.87") un pueblo del prepirineo ubicado a 697 metros de altitud y perteneciente al municipio de Campo, en la comarca de

la Ribagorza. La explotación se halla ubicada en las faldas del monte Cervín y en el valle del río Ésera. Se trata de una explotación con 1500 ovejas de la raza Xisqueta. El régimen de la explotación es semiintensivo. El sistema consta de tres pariciones, una que se extiende entre los meses de enero y febrero, siendo la más voluminosa, otra en los meses de julio y agosto y por último una en octubre. El porcentaje de reposición es variable dependiendo de las necesidades. Si necesita, deja normalmente animales de la parición de agosto. Los corderos destinados a matadero se destetan a los 45 días y se mantienen en cebo en la explotación hasta los 3 meses de edad. Las corderas de reposición, en el momento del destete permanecen con el rebaño saliendo a pastar.

El clima de la zona se caracteriza por contar con inviernos fríos y húmedos, siempre con nieve, y veranos más secos. En la época estival hay poca cantidad de nubes, lo que condiciona ese gran crecimiento vegetal, ya que la vegetación típica de la zona necesita gran cantidad de horas solares para su crecimiento. En el municipio de Campo, la pedanía a la que pertenece Beleder, el clima es cálido y templado con mucha lluvia, ya que tiene precipitaciones de características significativas. La temperatura media es de 9,7 grados y unas precipitaciones medias de 912 mm³/año. Los animales pastorean zonas de sotobosque, montaña y pastos variados.

4.2 Animales estudiados

Los animales objeto de estudio en este trabajo fueron las corderas de reposición disponibles de ambas explotaciones en el momento del inicio de la prueba, a finales de marzo de 2023. El estudio se desarrolló de esta manera en cada explotación:

En la explotación 1 se dispuso de 152 corderas de 4 meses de edad (nacidas en diciembre) las cuales fueron divididas de forma aleatoria en 3 grupos (51-50-51). Los animales fueron identificados de forma individual mediante collares de diferente color y numerados de forma individual en función del grupo al que pertenecían para favorecer el manejo y su seguimiento. Además, cada animal tenía su crotal individual propio de la explotación.

El grupo A compuesto por 51 corderas fue incluido como grupo control, no recibiendo ningún tratamiento y siendo identificado con collares numerados azules. El grupo B incluyó a 50 corderas. Dicho grupo fue tratado con el principio activo deltametrina pour-on mediante aplicación cutánea por unción dorsal continua (pour-On). Se realizó una única aplicación según prospecto. El nombre comercial es Butox suspensión pour-on de laboratorios Merck Sharp & Dohme Animal Health, S.L. Según la ficha técnica la dosis es de 75 mg deltametrina/animal, equivalente a 10 ml/animal. Este grupo fue identificado con collares numerados naranjas. Finalmente, el tercer grupo o grupo C estaba

compuesto por las 51 corderas restantes. En este caso el tratamiento aplicado fue con el principio activo cipermetrina pour-on mediante aplicación cutánea por unción dorsal continua (pour-On) en una única aplicación según prospecto. El nombre comercial es Cipermetriven pour-on de Laboratorios e industrias IVEN, S.A. (Madrid, España). Según la ficha técnica contiene 25 mg cipermetrina/kg, equivalente a 10 ml/10 kg p.v. Este grupo fue identificado con collares verdes.

Sin embargo, finalmente el estudio en esta explotación fue compuesto únicamente por 147 animales, puesto que en el muestreo inicial, tres de los animales mostraron resultado positivo en PCR a *Anaplasma ovis* (1 del grupo control (A) y dos del grupo C), y otros dos animales murieron durante la prueba (uno en el grupo A y otro en el grupo B). Por este motivo, los 3 grupos finalmente fueron formados por 49 animales cada uno distribuidos de manera aleatoria en los que se pudo realizar la prueba.

En el caso de la explotación 2 se disponía de 66 borregas de reposición de entre 6 y 7 meses de edad, nacidas en agosto de 2022, las cuales fueron divididos de forma aleatoria en 2 grupos de 33 animales cada uno. En este caso los grupos fueron identificados como grupo D, compuesto por 33 borregas. Dicho grupo fue tratado con el principio activo deltametrina pour-on mediante aplicación cutánea por unción dorsal continua (pour-On). Se realizó una única aplicación según prospecto, siendo el nombre comercial del producto utilizado DELTAVEX POUR-ON 7,5mg/ml emulsión para unción dorsal continua de SP VETERINARIA, S.A (Riudoms, España), aplicándose según ficha técnica a una dosis de 75mg deltametrina/animal, equivalente a 10 ml/animal. Este grupo fue identificado con collares de color rojo. El grupo E permaneció como grupo control sin tratamiento y fue identificado con collares amarillos.



Imágen 2 y 3. Corderas de ambas explotaciones con sus respectivos collares.

Sin embargo, tras el primer muestreo, dieciséis animales resultaron positivos mediante pruebas moleculares PCR a *Anaplasma ovis*, teniendo que ser descartados. De estos animales, tres pertenecían al grupo D tratado con deltametrina, mientras que las 13 corderas positivas restantes pertenecían al grupo control. Además, debido a un error de fabricación en los collares de color rojo, 4 animales perdieron su collar identificativo a lo largo de la prueba, teniendo que ser eliminados de la prueba al no poderse realizar su seguimiento, y otro animal, en este caso del grupo control, falleció. Por ello, finalmente los grupos quedaron compuestos por un número desequilibrado de animales: grupo D formado por 26 animales y grupo E control formado por 19 animales.

Según la ficha técnica de estos productos, el tratamiento ha de repetirse entre las 4 y 6 semanas tras el tratamiento inicial, solo en caso de que exista una reinfestación, a excepción del DELTAVEX POUR-ON 7,5mg/ml emulsión para unción dorsal continua, el cual no especifica en concreto cuanto tiempo se ha de esperar hasta poder tratar de nuevo. Debido a lo anterior, así como el período de prepatencia hasta que los animales una vez infectados puedan mostrar valores positivos de infección, se tomó esta referencia de tiempo para alargar los plazos, realizando visitas de seguimiento a las 3 semanas y a las 6 semanas. Los tratamientos se aplicaron simultáneamente en ambas explotaciones.

4.3 Examen clínico y evaluación de garrapatas

El estudio se llevó a cabo en tres muestreos centrados en la primavera de 2023, entre finales de marzo y la primera semana de mayo. La primera visita a ambas explotaciones se realizó el 22 de marzo (T0), momento en que los animales fueron chequeados para ver su estado general de salud, se agruparon de forma aleatoria en los distintos grupos, se les identificó y finalmente se aplicaron los

tratamientos correspondientes. Las siguientes visitas se realizaron 21 días después, el 12 de abril (T1) y 43 días después, el 3 de mayo (T2).

Se realizó un minucioso examen clínico inicial previo a la aplicación de los tratamientos el día 22 de marzo de 2023 (T0) para comprobar que los animales estaban sanos. Durante el examen se valoró la condición corporal, el color de las mucosas, y la presencia de signos clínicos patológicos en el aparato respiratorio, digestivo y locomotor. Igualmente se valoró externamente a los animales, prestando especial atención a las zonas predilectas por las garrapatas: pabellón auricular, labios, cara, cuello, axilas, zona inguinal y zona perianal (Martínez-Carrasco et al., 2010). Posteriormente se trató a los animales. Todas las garrapatas encontradas fueron retiradas de los animales y almacenadas en botes identificados para cada visita. De forma previa a ser retiradas, se anotó el número, localización y vitalidad de las garrapatas. Finalmente, las garrapatas recopiladas fueron clasificadas de forma individual según la clasificación taxonómica propuesta por Estrada-Peña et al. (2017).

El mismo procedimiento de examen clínico y evaluación de la presencia de garrapatas fue realizado en las visitas posteriores, a las 3 semanas de la aplicación de los tratamientos(T1) y a las 6 semanas (T2).

Muestras de sangre entera de cada animal fueron obtenidas en cada una de las tres visitas con sistema vacutainer, es decir, mediante sistema de vacío para extracción de sangre. Las agujas usadas fueron BD Vacutainer® PrecisionGlide™ 20GX1” (0.9X25mm) y los tubos VACUTEST® kima 4ml K₃ EDTA 7,2mg.



Imágenes 4 y 5. Exploración de pabellones auditivos en las corderas y garrapata adherida a una oveja del estudio

4.4 Análisis biomoleculares

Las muestras de sangre entera individuales obtenidas de todos los animales en cada visita fueron duplicadas en dos alícuotas iguales, siendo posteriormente una de ellas enviada al laboratorio EXOPOL S.L. (San Mateo de Gállego, España) y la otra almacenada en congelación a -20°C. Se realizó una qPCR a las muestras en pools de 5 animales. Los pools positivos fueron posteriormente analizados de forma individual para detectar aquellos animales afectados en concreto. La detección positiva a la bacteria se realizó utilizando el kit comercial EXOone *Anaplasma ovis* (EXOPOL S.L.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis se realiza mediante la copia y detección del gen *msp4* que permite la diferenciación específica de *A. ovis* frente a *A. marginale*.

Este ensayo qPCR tiene una sensibilidad analítica de 50 copias genómicas equivalentes/ reacción e incluye un control positivo sintético cuantificado. El ensayo tiene como objetivo la única copia del gen *msp4* que se ha demostrado que permite la diferenciación específica de *A. ovis* de su parecida *Anaplasma marginale*. El control endógeno también fue incluido en estos ensayos para evitar falsos negativos. La carga bacteriana se expresó usando el ciclo de cuantificación (Cq), el cual es el número de ciclo donde la curva de amplificación de la PCR intersecta el límite. El valor Cq se puede usar para cuantificar o determinar la presencia/ausencia de la secuencia objetivo.

El kit comercial MagMAX™ Pathogen RNA/DNA (Thermo Fisher Scientific, Austin, TX, USA), con un procesador magnético de partículas automatizado (KingFisher Flex System, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland), se usó para la extracción de ácidos nucleicos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La amplificación se llevó a cabo en la máquina QuantStudio 5 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Marsiling, Singapore), y los resultados se analizaron con el respectivo software (QuantStudio Design & Analysis software v1.5.1) (Lacasta et al. 2021).

Los animales que mostraron valores positivos en la muestra inicial (T0) fueron retirados del estudio al estar ya infectados de forma previa al comienzo del estudio y no poderse utilizar este parámetro como método de evaluación.

4.5 Análisis estadístico

Los grupos de tratamiento de cada explotación fueron tratados como variables de agrupación para todos los resultados. Se utilizó estadística descriptiva basada en recuentos y proporciones para determinar variables cualitativas: número de garrapatas, número de corderas parasitadas, número de corderas infectadas. Pruebas no paramétricas fueron realizadas para analizar estos resultados porque

las variables estudiadas no seguían los criterios de normalidad. El procedimiento seguido fueron los test de Friedman para muestras relacionadas. Las pruebas fueron realizadas con la herramienta software IBM SPSS Statistics V.22. Las diferencias entre grupos fueron analizadas para cada tiempo de muestreo según el test de Kruskal-Wallis. Pruebas de Chi-cuadrado fueron usadas para cada momento de muestreo para analizar la correlación en el número de corderas parasitadas con garrapatas.

5. RESULTADOS

5.1. Prevalencia inicial

En el muestreo inicial realizado en la explotación 1, tres de las borregas ya mostraron un valor cQ positivo de 26, indicando que esos animales ya se encontraban infectados de forma previa al comienzo del estudio, motivo por el cual fueron descartados. Sin embargo este resultado también demuestra un valor útil al permitir conocer la prevalencia inicial de animales infectados en dicha explotación en el lote de borregas, siendo en concreto de 1,97% (3/152).

De la misma forma, en la explotación 2 también se encontraron animales con valores positivos en la prueba molecular qPCR realizada en la primera visita, demostrando que ya estaban infectados previamente, motivo por el cual fueron desechados. En concreto se encontraron 16 animales positivos del total de 66 borregas disponibles en la explotación, lo que supone una prevalencia en este lote del 24.24% (16/66). En este caso, los valores cQ obtenidos tras la realización de la prueba qPCR se encontraban entre 24 y 31.

5.2. Clasificación taxonómica de garrapatas

El 100% de las 35 garrapatas encontradas en la explotación 1 sita en Apiés fueron identificadas como *Rhipicephalus sanguineus*, habiendo sido analizadas siguiendo los criterios de clasificación taxonómica propuestos por Estrada-Peña et al., en 2017 y los ejemplos expuestos en el libro publicado por Estrada-Peña en 2015a. Siguiendo esos mismos criterios, las garrapatas fueron clasificadas según su estado de desarrollo y su sexo. No se encontró ninguna garrapata en estado larvario, mientras que se encontraron 2 ninfas, y el resto fueron individuos adultos, en total 33. Dentro de estos individuos adultos encontramos 10 hembras, las cuáles se encontraban en fase de alimentación, siendo el resto clasificados como machos siguiendo estos criterios.

En la explotación 2, se encontró un número menor de garrapatas, tan solo 8, las cuáles, siguiendo los mismos criterios de clasificación anteriores fueron identificadas también como *Rhipicephalus sanguineus*. En este caso solo se encontraron individuos adultos, siendo 5 identificados como hembras y 3 como machos.



Imágenes 6 y 7. Ejemplares de *Rhipicephalus sanguineus* en diferentes estadios encontradas en los animales del estudio y hembra de *R. sanguineus* llena de sangre.

5.3. Examen clínico y evaluación de la presencia de garrapatas

Una vez descartados los animales positivos en un primer momento, se evaluó la presencia de garrapatas en los animales. En la explotación 1 (147 borregas) en T0 no apareció ninguna garrapata, mientras que en las dos visitas siguientes sí pudieron encontrarse. En T1 se vieron 2 corderas con garrapatas de 147 lo que supone un 1,36% del total, mientras que en T2 el número observado fue mayor, observándose hasta un total de 22 corderas parasitadas, lo que supone un 14,97% (22/147) (Tabla 1). Igualmente se analizaron las diferencias estadísticas entre grupos en cada visita. En la primera visita (T0), al no encontrar animales parasitados no se pudieron realizar las pruebas estadísticas. Sin embargo, sí pudieron realizarse en las dos siguientes visitas (T1 y T2), si bien no mostraron diferencias significativas en ninguna de las dos. A pesar de no ser estadísticamente significativas, sí se observaron diferencias entre grupos en T1, con un valor de $p = 0.602$, y diferencias aún mayores entre los grupos en T2, $p = 0.223$, si bien seguían sin ser significativas para el número de corderas parasitadas.

	Garrapatas T0		Garrapatas T1		Garrapatas T2	
	Corderas afectadas	Nº de garrapatas encontradas	Corderas afectadas	Nº de garrapatas encontradas	Corderas afectadas	Nº de garrapatas encontradas

Grupo A (49)	0 (0%)	0	0 (0%)	0	7 (14,29%)	10
Grupo B (49)	0 (0%)	0	1 (2,04%)	1	4 (8,16%)	8
Grupo C (49)	0 (0%)	0	1 (2,04%)	1	11 (22,45%)	15
Total (147)	0 (0%)	0	2 (1,36%)	2	22 (14,97%)	33

Tabla 1. Resultados de los muestreos en la Explotación 1; corderas parasitadas por garrapatas y número de garrapatas encontradas.

Respecto al número de garrapatas, también se analizó estadísticamente el número de garrapatas encontrado en cada grupo y para cada visita. De nuevo, al no encontrarse garrapatas en ninguno de los animales en T0, no se obtuvieron diferencias. Por el contrario, tanto en T1 como en T2 se obtuvieron diferencias entre grupos, si bien en ninguno de los dos casos dichas diferencias fueron estadísticamente significativas: $p=0,604$ en T1 y $p=0,242$ en T2.

Respecto a la explotación 2 en la que finalmente se dispuso de un total de 45 borregas, no se apreciaron garrapatas ni en T0 ni en T1. Por el contrario, en T2 si que pudieron apreciarse garrapatas en un total de 5 corderas, lo que supone que el 11,11%(5/45) de los animales estudiados estaba parasitado en ese momento, y en ambos grupos (Tabla 2). El análisis estadístico para el número de corderas parasitadas demostró diferencias entre los dos grupos en T2 ($p=0,465$), si bien estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Respecto al número total de garrapatas igualmente se apreciaron diferencias entre grupos ($p=0,456$) aunque tampoco fueron estadísticamente significativas.

	Garrapatas T0	Garrapatas T1	Garrapatas T2
--	---------------	---------------	---------------

	Corderas afectadas	Nº de garrapatas encontradas	Corderas afectadas	Nº de garrapatas encontradas	Corderas afectadas	Nº de garrapatas encontradas
Grupo D (26)	0 (0%)	0	0 (0%)	0	3 (11,54%)	5
Grupo E (19)	0 (0%)	0	0 (0%)	0	2 (10,53%)	3
Total (45)	0 (0%)	0	0 (0%)	0	5 (11,11%)	8

Tabla 2. Resultados de los muestreos en la Explotación 2; corderas parasitadas por garrapatas y número de garrapatas encontradas.

5.4. Análisis moleculares

En la explotación 1, una vez fueron descartadas las 3 corderas positivas encontradas en la primera visita así como los 2 animales que fallecieron a lo largo del estudio, no se encontraron animales hasta la tercera visita (T2), momento en el cual uno de los pools analizados del grupo B tratado con deltametrina fue positivo con un valor cQ de 27 para *Anaplasma ovis*. Por ese motivo, los 5 animales de dicho pool fueron analizados individualmente, siendo un único animal positivo con un valor cQ de 25 (Tabla 3). Respecto al estudio estadístico de estos valores, al no disponer de animales positivos en T0 y T1 no se pudieron obtener diferencias, mientras que en T2 si se obtuvieron diferencias entre grupos ($p=0,368$), si bien no fueron estadísticamente significativas.

GRUPO (N)	T0 (22/03/2023)	T1 (12/04/2023)	T2 (03/05/2023)
Grupo A (49)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Grupo B (49)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2,04%)
Grupo C (49)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total (147)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.68%)

Tabla 3. Resultados de los muestreos en la Explotación 1; animales positivos a *Anaplasma ovis* mediante pruebas moleculares PCR.

En la explotación 2 en T0 se encontraron ya números animales positivos cuyo momento de infección era desconocido, motivo por el que fueron descartados, así como las corderas que perdieron su identificación y la que falleció. Por ello, se parte del total de 45 animales que no era positivo en T0. Sin embargo, en T1, ya 2 de los animales del lote D, tratado con deltametrina, mostraron resultados positivos, con una cQ baja de 30 y 31, que indicaban baja carga infecciosa. Finalmente, en T2, dichos animales positivos volvieron a dar valor positivo, esta vez con valor cQ más bajo, de 25 y 27 respectivamente. Además, un nuevo animal de este grupo D mostró un valor positivo cQ bajo (24) en el momento T2, haciendo un total de 3 animales positivos en este grupo y este momento. Por el contrario, ningún animal del grupo control fue positivo en ninguno de los muestreos realizados (Tabla 4). El estudio estadístico demostró la presencia de diferencias notables entre grupos, $p=0,221$ en T1 y de $p=0,130$ en T2, si bien estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

GRUPO (N)	T0 (22/03/2023)	T1 (12/04/2023)	T2 (03/05/2023)
Grupo D (26)	0 (0%)	2 (7,69%)	3 (11,54%)
Grupo E (19)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total (45)	0 (0%)	2 (4,44%)	3 (6,67%)

Tabla 4. Resultados de los muestreos en la Explotación 2; animales positivos a *Anaplasma ovis* mediante pruebas moleculares PCR.

6. DISCUSIÓN

La anaplasmosis ovina es una patología emergente en Europa y cada vez existen casos en más países (Hornok et al., 2007; Renneker et al., 2013). España convive con la anaplasmosis por lo menos desde el año 2014, momento en el que se diagnosticó el primer caso de la enfermedad afectando a varios rebaños en el Matarraña. A raíz de ese brote se realizó un estudio epidemiológico de la zona afectada en el que se observaba una alta presencia de la bacteria en rebaños con clínica y sin ella (Lacasta et al., 2021). 9 años más tarde se sabe con certeza que es una enfermedad silente que es capaz de infectar animales sin mostrar apenas signos clínicos, pero que puede provocar grandes brotes clínicos con importantes pérdidas económicas. Debido a su capacidad de infectar sin mostrar clínica era de esperar que se hubiese extendido por toda la Comunidad Autónoma de Aragón, llegando incluso a zonas del Prepirineo y Pirineo. De hecho, ambas explotaciones han remitido casos clínicos diagnosticados como anaplasmosis ovina, afectando tanto a corderos, en el caso de Apiés, como a ovejas adultas, en el caso de Beleder de Campo, a las instalaciones del Servicio Clínico de Rumiantes (SCRUM). Esta fue una de las razones por las que se eligieron estas explotaciones, al saber que la bacteria se encuentra en los animales y causa pérdidas y problemas a los ganaderos en cuestión.

Se eligieron borregas debido a que la mayoría de problemas aparecían en el primer parto (Jiménez et al. 2015). Estas borregas tenían edades entre los 4 y los 6-7 meses de edad en el momento del estudio, que fue la primavera de 2023, momento de máxima actividad biológica de las garrapatas (Pfaffle et al., 2013; Matei et al., 2019). Por eso se eligieron los meses de marzo, abril y mayo para llevar a cabo el estudio, puesto que los animales habían permanecido estabulados durante el invierno, sin contacto esperado con garrapatas. En ambas explotaciones partimos con un número de animales afectados de forma inicial, si bien fue diferente en cada explotación. Mientras que en Apiés (explotación 1) únicamente había un 1,97% (3/152) de animales infectados, en Beleder el porcentaje de afectadas era bastante mayor: 24,24% (16/66). Estas diferencias inicialmente inesperadas pueden ser explicadas por la edad de los animales y el momento de nacimiento. Mientras que en Apiés las corderas nacieron en pleno invierno (diciembre de 2022) y no salieron a pastar hasta finales de marzo debido a la escasez de comida en el campo, en Beleder los animales tenían entre 6 y 7 meses de edad, y habían nacido en agosto de 2022. Si bien durante el invierno permanecieron estabuladas,

durante el otoño habían pastoreado con sus madres y pudieron haber entrado en contacto con garrapatas, pues es otro momento de actividad de las garrapatas.

Otro factor clave durante la primavera de 2023 fue tanto la temperatura como la escasa acumulación de precipitación, factores determinantes en la epidemiología de las garrapatas. De hecho, según casos de la Agencia Española de Meteorología (AEMET), la primavera de 2023 fue la primavera más cálida y la segunda más seca de la serie histórica, con una precipitación acumulada en la España peninsular de 95 l/m² (AEMET, 2023). Estos factores climáticos pudieron ser determinantes para explicar la escasez de garrapatas observada durante el estudio, puesto que requieren de condiciones mayores de humedad para su desarrollo y evitar la desecación, su principal limitante (Pfaffle et al., 2013; Matei et al., 2019). Sin embargo, estas condiciones climáticas tan secas y cálidas pueden provocar situaciones de sequía importante, que produzcan escasez de alimento para las ovejas, y sobre todo, las corderas, que necesitan acostumbrarse a pastorear una vez destetadas. De hecho, esta escasez de alimento y la sequía es considerado como un factor estresante que favorece la aparición de casos clínicos y brotes graves de anaplasmosis ovina (Renneker et al., 2013). A pesar de ello, los ganaderos de ambas explotaciones refirieron que tanto los pastores que acudían al campo con los animales como los perros que les ayudaban presentaban garrapatas, por lo que en el campo sí había presencia de estos parásitos. Por ello, a pesar de que los estudios fueron realizados con un número de muestra escaso, parece ser que los productos si son capaces de controlar la infección por garrapatas en los animales tratados, e incluso en los grupos control, puesto que algunos autores refieren un posible efecto repelente de estos productos (Stuen et al., 2012)

La totalidad de las garrapatas clasificadas fueron *Rhipicephalus sanguineus*, no es de extrañar, puesto que es una garrapata de climas cálidos y el estudio se ha llevado a cabo en una de las primaveras más calurosas (AEMET, 2023), bien es cierto que se podrían haber esperado ejemplares de *Ixodes ricinus* en la explotación 2, ya que su ubicación próxima al Pirineo hace que se trate de un clima más frío, siendo éstas garrapatas más características de climas fríos, como en la cornisa cantábrica o el Pirineo en España, así como en los países nórdicos (Estrada-Peña et al., 2013; Porretta et al., 2013; Cunze et al., 2022; Noll et al., 2023).

En cuanto a las garrapatas encontradas, tanto en la explotación 1 (Apiés) como en la explotación 2 (Beleder de Campo), se observaron resultados similares. El número de garrapatas fue incrementando conforme avanzó la primavera, y fue en la última visita (T2) donde se encontró el mayor número de garrapatas en ambas granjas. Además, para ese momento los animales ya llevaban pastoreando más

de un mes de forma continuada, lo que favorece su exposición a las garrapatas. Además, el hecho de que los 2 productos probados permitan tratar de nuevo a partir de las 4-6 semanas, puede indicar que para ese momento ya han perdido parte de su eficacia. A pesar de todo, los resultados no fueron los esperados puesto que se observó un mayor número de garrapatas en los grupos tratados que en los grupo control, en ambas explotaciones.

Cabe destacar que algunos autores, como Stuen et al. 2012, proponen que el tratamiento frecuente con piretroides deja de tener un 100% de efectividad frente a la infestación de garrapatas a la segunda semana tras su aplicación. Sin embargo en nuestro caso, en el momento T1 no se observaron apenas corderas parasitadas, por lo que se puede suponer que dichos productos aun mantenían su efecto.. Este dato está corroborado con otros estudios que indican que las garrapatas pueden ser encontradas en animales 13 o 14 días post-tratamiento con cipermetrina o deltametrina (Mitchell et al. 1986, Henderson et al. 1987, Hardeng et al. 1992) Por ello, a pesar de estos estudios, el tratamiento con piretroides hasta ahora ha demostrado niveles muy bajos o nulos de resistencia en las garrapatas (Stuen et al., 2012), por lo que el tratamiento con piretroides en los momentos de mayor presencia de garrapatas puede ser una medida clave para la prevención de la anaplasmosis.

Solo se encontraron unas pocas garrapatas en los animales. La razón de esto es desconocida, pero las garrapatas han podido agarrarse y soltarse sin ser vistas, puesto que el periodo de parasitación en animales en todas las edades suele ser entre 14 y 21 días (MacLeod, 1932). Otro factor pudo ser un error humano en la exploración de las garrapatas, puesto que a pesar de que la mayoría de ellas se localizan en las zonas muestreadas, pueden también apreciarse en otras localizaciones como zonas inguinales y en la axila (Arthur, 1962, Henderson, 1987), si bien al tratarse de un estudio de campo la posibilidad de estudiar de forma pormenorizada todas las localizaciones del animal no es posible tal y como puede ocurrir en estudios experimentales controlados.

Sería interesante repetir este estudio con mayor volumen de animales y con condiciones climatológicas más favorables para la epidemiología de la garrapata, con el fin de obtener resultados más fiables. Igualmente sería conveniente realizar un mayor número de visitas con menor espacio de tiempo entre ellas para así monitorizar y hacer un seguimiento mejor de los animales, en concreto de la presencia de garrapatas. A pesar de ello, los resultados son esperanzadores como demuestra el estudio, puesto que el número de animales que ha positividadado o ha sido parasitado por garrapatas durante el estudio ha sido muy bajo, de tal manera que se ha de tener en cuenta a los tratamientos insecticidas frente a garrapatas como una herramienta fundamental en el control de la anaplasmosis

ovina, así como otras posibles enfermedades transmitidas por vectores, muchas de ellas con potencial factor zoonótico. El aumento de casos de la enfermedad, así como su presumible expansión por gran parte del país y el valor de las diferentes especies de *Anaplasma* como potencial zoonosis suponen un incentivo más que suficiente para seguir investigando herramientas de control frente a la anaplasmosis ovina y otras enfermedades transmitidas por garrapatas.

7. CONCLUSIONES

7.1. Conclusiones

Basándonos en los resultados obtenidos en las pruebas aquí presentadas, se puede concluir que el uso de ambos tratamientos antiparasitarios a base de piretroides sintéticos (deltametrina y cipermetrina) es capaz de prevenir parasitaciones masivas de garrapatas en las corderas de reposición cuando es aplicado en un momento favorable para la actividad como las garrapatas como la primavera, si bien más estudios y en otras condiciones climáticas son necesarios para conocer medidas eficaces para el control de la anaplasmosis ovina.

Igualmente se necesitan otros estudios que demuestren la importancia real y su extensión geográfica tanto a nivel regional como nacional o internacional para conocer la verdadera extensión de la anaplasmosis ovina, y por ende de la fisiopatología de la enfermedad y sus vectores de transmisión.

El conocimiento y la aplicación de medidas de prevención, no únicamente basándose en tratamientos antiparasitarios, de la anaplasmosis ovina, así como de otras enfermedades transmitidas por garrapatas es fundamental y ha de ser entendida y propuesta desde un enfoque One health, debido en gran parte al potencial zoonótico de estas patologías.

Finalmente concluir que las condiciones meteorológicas son un factor determinante tanto en la aparición de casos clínicos graves como en la epidemiología de la garrapata. Por lo que más estudios que permitan conocer tanto las condiciones climáticas ideales para el desarrollo de las diferentes especies de garrapatas implicadas en la transmisión de estas enfermedades así como las zonas de distribución de estas garrapatas son fundamentales para poder aplicar las medidas preventivas de la forma más eficaz y adecuada.

7.2. Conclusions

Based on the results obtained in the tests presented here, it can be concluded that the use of both synthetic pyrethroid-based antiparasitic treatments (deltamethrin and cypermethrin) is capable of preventing massive tick parasitizations in reposition ewes when applied on a favorable moment for tick activity, such as in the spring. Although other studies and other climatology are necessary in order to know effective control measures for ovine anaplasmosis.

Either way further studies are needed to demonstrate the real significance and its geographic extent, both to regional, national or international levels in order to understand the true extension of ovine anaplasmosis, and thus its physiology and its transmission vectors.

The knowledge and application of preventive measures for ovine anaplasmosis, not only based on antiparasitic treatments, but also other tick-borne illnesses is essential and has to be understood and proposed by a One health approach, given the potential zoonotic nature of these diseases.

Finally, it can be concluded that weather conditions are a determining factor both in apparition of severe clinic cases such as the tick's epidemiology. Hence more studies are crucial to determine both the ideal climatic conditions for the development of different tick species involved in the transmission of these diseases as in the distribution areas of these ticks are essential to apply preventive measures in a more effective and appropriate way.

8. VALORACIÓN PERSONAL

El realizar un trabajo experimental y a la vez bibliográfico me ha permitido desarrollar mis habilidades tanto de manejo como de búsqueda de información. Por un lado, que el trabajo tenga su parte de campo me ha ayudado a relacionarme con ganaderos y ganar experiencia en manejo de ovino; manejo en la manga, sacar sangre, exploraciones,... El poder ir en repetidas ocasiones a explotaciones de ovino en época en las que las ovejas se encuentran en régimen extensivo es un privilegio ya que se puede apreciar el trabajo y sacrificio que conlleva tener animales a tu cargo. A parte de lo anterior, bajo mi punto de vista es muy importante relacionarse con los ganaderos y conocer sus inquietudes a la hora de trabajar, ya que al final nuestro trabajo como veterinarios sin el suyo no tiene lugar, por lo tanto creo que es muy importante respetar y escuchar a los ganaderos y trabajadores de las explotaciones.

En cuanto a lo bibliográfico he podido ver la cantidad de personas alrededor del mundo que se dedican al estudio de las enfermedades, y que, en la mayoría de los casos, viven, o han vivido, situaciones similares a las que nos encontramos nosotros actualmente en España con el tema de la Anaplasmosis, por ello es fundamental leer y aprender de autores de otros países que llevan lidiando con la enfermedad muchos más años que nosotros.

También he podido ver lo difícil que es llevar a cabo un trabajo de investigación y lo complicado que es sacarlo hacia delante, y que muchas veces los resultados no son los que esperabas.

Por último me gustaría agradecer varias personas, sin las cuales no habría sido posible realizar este trabajo; primero a mi abuelo José Lancuentra padre y mi tío José Lancuentra hijo por dejarme un lote de corderas en Campo para “hacer cosas de la facultad”, por otro lado a la familia Yebra, propietarios de la explotación de Apiés. A Lucas Grasa por acompañarme y ayudarme a sangrar aunque vaya “hasta arriba de faena”. A Marta Ruiz de Arcaute y Hector Ruiz por ser unos tutores excelentes. A todo el profesorado y compañeros del SCRUM y por último a mi madre Ana Lancuentra por estar ahí siempre.

9. BIBLIOGRAFÍA

AEMET (2023) “Avance Climático Nacional de primavera de 2023”. Disponible en: https://www.aemet.es/es/noticias/2023/06/avance_primavera_2023 [Consultado 25/8/2023].

Arthur, D.R. (1962) “*Ticks and diseases*”. Oxford: Pergamon Press, 236-269.

Barandika, J.F. (2013). “*Infeción por anaplasmas y piroplasmas en un rebaño ovino de raza Latxa a lo largo del periodo de pastoreo en monte*”. Soc. Española Ovinotecnia y Caprinotecnia XXXVIII.

Bauer, B.U., Răileanu, C., Tauchmann, O., Fischer, S., Ambros, C., Silaghi, C., Ganter, M. (2021). “*Anaplasma phagocytophilum and Anaplasma ovis*—Emerging Pathogens in the German Sheep Population” *Pathogens* 2021, 10, 1298.

Bauer, B.U., Runge, M., Schneider, M., Könenkamp, L., Steffen, I., Rubel, W., Ganter, M., Schoneberg, C. (2023). “*Co-exposure to Anaplasma spp., Coxiella burnetii and tick-borne encephalitis virus in sheep in southern Germany*”. *Acta Vet Scand.* 2023 Feb 15;65(1):6. DOI: 10.1186/s13028-022-00659-6. PMID: 36793116; PMCID: PMC9933384.

Bautista, G. (1996). “*La respuesta inmune celular en anaplasmosis bovina*”. *Ciencia Veterinaria*, 7(24), 315–329.

Berthelsson, J., Ramabu, S. S., Lysholm, S., Aspán, A. y Wensman, J. J. (2019). “*Anaplasma ovis infection in goat flocks around Gaborone, Botswana*”. *Comparative Clinical Pathology.* 29(1), 167–172. DOI: 10.1007/s00580-019-03044-4

Brayton, K. A. (2012). “*Transmisión de Anaplasma marginale por garrapatas*”. *Rev Mex Cienc Pecuarias* 2012;3 (Supl 1): 41- 50.

Brown, W.C., Shkap, V., Zhu, D., McGuire, T.C., Tuo, W., McElwain, T.F., Palmer, G.H., (1998). “*CD4+ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with Anaplasma marginale outer membranes and protected against homologous challenge*”. *Infect.Immun.* 66, 5406–5413.

Coetzee, J. F., Apley, M. D. (2006). “*Efficacy of enrofloxacin against severe experimental Anaplasma marginale infections in splenectomized calves*”. *Therapeutics* Vol. 7, Nº 4, Winter 2006.

Cunze, S., Glock, G., Kochmann, J., Klimpel, S. (2022). “*Ticks on the move—climate change-induced range shifts of three tick species in Europe: current and future habitat suitability for Ixodes ricinus in*

comparison with *Dermacentor reticulatus* and *Dermacentor marginatus*". Parasitol Res **121**, 2241–2252 (2022). DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07556-x>.

De la Fuente, J., Ruiz-Fons, F., Naranjo, V., Torina, A., Rodríguez, O., Gortázar, C., (2008). "Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain". Res. Vet. Sci. **84**, 382–386.

Díaz-Cao, J. M., Adaszek, Ł., Dzięgiel, B., Paniagua, J., Caballero-Gómez, J., Winiarczyk, S., García-Bocanegra, I. (2022). "Prevalence of selected tick-borne pathogens in wild ungulates and ticks in southern Spain". Transboundary and Emerging Diseases, **69**(3), 1084-1094.

Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., et al. (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. **2001**;51:2145–65.

Eriks, I. S.; Palmer, G. H.; McGuire, T. C. y Barbet, A. F. (1989). "Detection and quantification of *Anaplasma marginale* in carrier by using a nucleic acid probe". Clin. Microbiol. **27**: 279- 284.

Estrada-Peña, A., D'Amico, G., Palomar, A.M., Dupraz, M., Fonville, M., Heylenf, D., Habela M.A., Hornok, S., Lempereur, L., Madder, M., Nunciok, M.S., Otrantol, D., Pfaffle, M., Plantard, O., Santos-Silva, M.M., Spronge, H., Vatansever, Z., Vial, L., Mihalca A.D. (2017) "A comparative test of ixodid tick identification by a network of European researchers" Ticks and Tick-borne Diseases **8** (2017) 540–546.

Estrada-Peña, A., Farkas, R., Jaenson, T.G.T. et al. (2013). " Association of environmental traits with the geographic ranges of ticks (Acari: Ixodidae) of medical and veterinary importance in the western Palearctic". A digital data set. Exp Appl Acarol **59**, 351–366 (2013). <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9600-7>.

Estrada Peña, A. (2015 a). "Garrapatas. Morfología, fisiología y ecología." Ed LATAM.

Estrada-Peña, A. (2015 b). "CLASE ARACHNIDA Orden Ixodida: Las garrapatas". Revista IDE@ - SEA, nº **13** (30-06-2015): 1–15.

Hardeng, F., Baalsrud, K.J., Øvernes, G. (1992) "Controlling tick infestations and diseases in sheep by pour-on formulations of synthetic pyrethroids". A field study. *Vet Res Commun.* 1992, 16: 429-436. 10.1007/BF01839020.

Henderson, D., Stevens, D.P. (1987) "Cypermethrin pour-on for the control of ticks (*Ixodes ricinus*) on sheep". *Vet Rec.* 1987, 121: 317-319. 10.1136/vr.121.14.317.

Hornok, S., Elek, V., de la Fuente, J., Naranjo, V., Farkas, R., Majoros, G., Földvári, G. (2007). "First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary" *Veterinary Microbiology*, Volume 122, Issues 3–4, 21 June 2007, Pages 316-322.

Jimenez, J.C., Lacasta, D. (2015). "Estudios sobre la anaplamosis ovina en la comarca del Matarraña (Teruel)" Trabajo de Fin de Grado, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.

Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Coetzee, J.F., Ewing, S.A. (2009). "The natural history of *Anaplasma marginale*". *Vet Parasitol.* 2010 Feb 10;167(2-4):95-107. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.09.012. Epub 2009 Sep 19. PMID: 19811876.

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, 285–300.

Lacasta, D., Lorenzo, M., González, J.M., Ruiz de Arcaute, M., Benito, A.Á., Baselga, C., Milian, M.E., Lorenzo, N., Jiménez, C., Villanueva-Saz, S., Ferrer, L.M. (2021). "Epidemiological Study Related to the First Outbreak of Ovine Anaplasmosis in Spain". *Animals (Basel)*. 2021 Jul 8;11(7):2036. doi: 10.3390/ani11072036. PMID: 34359164; PMCID: PMC8300400.

Lacasta, D., Ruiz, H., Ortín, A., Villanueva-Saz, S., Estrada-Peña, A., González, J.M., Ramos, J.J., Ferrer, L.M., Benito, A.A., Labanda, R., Malo, C., Verde, M.T., Fernández, A., Ruiz de Arcaute, M. (2022). "Comparative study of the use of doxycycline and oxytetracycline to treat anaplasmosis infattening lambs". *Animals* 2022, 12, 2279.

Lorenzo, M., Lacasta, D. (2016). "Estudios sobre la anaplasmosis ovina en la comarca del Matarraña (Teruel)." Trabajo de fin de Grado, Veterinaria. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.

MacLeod, J. (1932) "The bionomics of *Ixodes ricinus* L. the "sheep tick" of Scotland". *Parasitology.* 1932, 24: 382-400. 10.1017/S0031182000020795.

Martinez-Carrasco, C., Goyena, E., Ortiz, J.M., Ruiz de Ybañez, M.R., (2010). “*Ectoparásitos arácnidos presentes en el ganado ovino y caprino*” Revista Ganadería, ISSN, Junio- julio 2010. pp. 30-35.

Mason, K.L., Gonzalez, M.V., Chung, C., et al. (2017). “*Validation of an improved Anaplasma antibody competitive ELISA for detection of Anaplasma ovis antibody in domestic sheep*”. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2017;29(5):763-766. DOI: 10.1177/1040638717709494.

Matei, I.A., Estrada-Peña, A., Cutler, S.J., Vayssier-Taussat, M., Varela-Castro, L., Potkonjak, A., Zeller, H., Mihalca, A.D. (2019). “*A review on the eco-epidemiology and clinical management of human granulocytic anaplasmosis and its agent in Europe*”. Parasites Vectors 12, 599 DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3852-6>.

Mitchell, G.B.B., Webster, K.A., Wright, C.L. (1986). “*Use of deltamethrin “pour-on” for control of the sheep tick Ixodes ricinus*”. Vet Rec. 1986, 119: 156-157.

Noll, M., Wall, R., Makepeace, B. L., Vineer, H. R. (2023). “*Distribution of ticks in the Western Palearctic: an updated systematic review (2015–2021)*”. Parasites & vectors, 16(1), 141.

OIE. (2012). “*Bovine Anaplasmosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*”. VI (May), 589–600.

Palmer, G.H., McGuire, T.C. (1984). “*Immune serum against Anaplasma marginale initial bodies neutralizes infectivity for cattle*”. J Immunol 1 August 1984; 133 (2): 1010–1015.

Pfäffle, M., Littwin, N., Muders, S. V., & Petney, T. N. (2013). “*The ecology of tick-borne diseases*”. International journal for parasitology, 43(12-13), 1059-1077.

Porretta, D., Mastrantonio, V., Amendolia, S. et al. (2013). “*Effects of global changes on the climatic niche of the tick Ixodes ricinus inferred by species distribution modelling*”. Parasites Vectors 6, 271 (2013). DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-271>.

Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S., Hartigan, P.J., (2011). “*Veterinary Microbiology and Microbial Disease*”. (2a edición) Chichester: Wiley-Blackwell.

Reinbold, J., Coetzee, J., Hollis, L., Nickell, J., Riegel, C., Olson, K.C., Ganta, R. (2010). “*The efficacy of three chlortetracycline regimens in the treatment of persistent Anaplasma marginale infection*” Veterinary Microbiology 145 (2010) pp. 69–75.

Renneker S, Abdo J, Salih DE, Karagenc T, Bilgic H, Torina A, et al. (2013). "Can *Anaplasma ovis* in small ruminants be neglected any longer?" *Transbound Emerg Dis*. 2013;60(Suppl 2):105–112. DOI: 10.1111/tbed.12149.

Ristic, M. y Kreier, J.P., (1984). "Malaria and babesiosis: similarities and differences". New Perspectives in Clinical Microbiology book series. NPCM, volume 7.

Ristic, M. y Watrach, A. M. (1963). "Anaplasmosis. VI. Studies and hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent". *Am. Vet. Res.* 24: 267-277.

Ruiz, H., Ramos, J.J., Ferrer, L.M., Ruiz de Arcaute, M., Ortín, A., Villanueva, S., Lacasta, D., (2023). "Anaplasmosis ovina, un problema al alza". Grupo de Bienestar y Patología en los pequeños rumiantes. Instituto Agroalimentario de Aragón. Revista Ganadería, Febrero 2023.

Ruiz, H., Ruiz de Arcaute, M., Lacasta, D., Villanueva-Saz, S., Benito, A.A., Saz, S., Jiménez, J.C. (2023). "Long-lasting infection with *Anaplasma ovis* in sheep". *Veterinary Research Communications*, 1-5.

Ruiz, H., Sanz, S., Labanda, R., Lacasta, D., Ferrer, L.M., González, J.M., Benito, A.A., Rodríguez-Largo, A., Ramos, J.J. (2020). "Anaplasmosis ovina en España" *Mundo ganadero*. Septiembre/octubre 2020, pp. 48-52.

Rymaszewska, A., Grenda. S. (2008) "Bacteria of the genus *Anaplasma* – characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review." *Veterinarni Medicina*, 53, 2008 (11): 573–584.

Sanz, S., Labanda, R., Ruiz, H., Lacasta, D., Ferrer, L.M., González, J.M., Benito, A.A., Rodríguez-Largo, A., Ramos, J.J. (2020). "Descripción de un brote de anaplasmosis ovina en corderos de cebo" *Tierras Ovino*. 032 2020, pp. 84-90.

Stich, R.W., Sauer, J.R., Bantle, J.A., Kocan, K. M. (1993). "Detection of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Secretagogue-Induced Oral Secretions of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) with the Polymerase Chain Reaction" *Journal of Medical Entomology*, Volume 30, Issue 4, 1 July 1993, Pages 789–794.

Stuen, S., Enemark, J.M., Artursson, K. et al. (2012). "Prophylactic treatment with flumethrin, a pyrethroid (Bayticol®, Bayer), against *Anaplasma phagocytophilum* infection in lambs". *Acta Vet Scand* 54, 31 (2012). DOI: <https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-31>

Stuen, S., Oppegaard, A.S., Bergström, K., Moum, T. (2005). "*Anaplasma phagocytophilum* infection in north Norway". The first laboratory confirmed case. *Acta Vet Scand.* 2005;46(3):167-71. DOI: 10.1186/1751-0147-46-167. PMID: 16261930; PMCID: PMC1624813.

Stuen, S. (1997) "*Utbredelsen av sjodogg (tick-borne fever) i Norge [In Norwegian]*". *Nor Vet Tidsskr.* 1997, 109: 83-87.

Stuen, S. (2016). "*Haemoparasites in small ruminants in European countries: Challenges and clinical relevance*". *Small Ruminant Research*, Volume 142, Pages 22-27, ISSN 0921-4488.

Suarez, C. E., Noh, S. (2011). "*Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis*". *Vet Parasitol*, 180(1-2), 109–125.

Trueblood, S. E., Palmer, G. H. (1998). "*Anaplasmosis: A Review of Diagnostic Techniques*". 8th National Veterinary hemoparasite Disease Conference.

Uilenberg, G. (1997). "*General review of tick-borne diseases of sheep and goats world-wide*". *Parassitologia*, 39(2), 161-165.

Yang, J., Han, R., Niu, Q., Liu, Z., Guan, G., Liu, G., Yin, H. (2018). "*Occurrence of four *Anaplasma* species with veterinary and public health significance in sheep, northwestern China*". *Ticks and Tick-borne Diseases*, 9(1), 82-85.

Zhao, L., He, B., Li, K. R., Li, F., Zhang, L. Y., Li, X. Q., & Liu, Y. H. (2018). "*First report of *Anaplasma ovis* in pupal and adult *Melophagus ovinus* (sheep ked) collected in South Xinjiang, China*". *Parasites & vectors*, 11, 1-6.