



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado

**Estudios sobre la anaplasmosis ovina en la Comarca del  
Matarraña (Teruel)  
Infección Experimental con *Anaplasma ovis***

Autor/es

José Calasanz Jiménez Gracia

Director/es

Dr. Delia Lacasta Lozano

Facultad de Veterinaria de Zaragoza  
2015

---

# ÍNDICE

---

RESUMEN/ SUMMARY.....	Pág. 3
1. INTRODUCCIÓN.....	Pág. 5
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	Pág. 13
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	Pág. 14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	Pág. 18
5. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS.....	Pág. 27
6. VALORACIÓN PERSONAL.....	Pág. 28
7. BIBLIOGRAFÍA.....	Pág. 29

## RESUMEN

Tras haber diagnosticado en el curso 2013-2014 un caso de anaplasmosis ovina, remitido al SCRUM (Servicio Clínico de Rumiantes del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Zaragoza) se decide abordar una investigación más profunda sobre dicha enfermedad. Este trabajo se engloba dentro de un trabajo mayor, compuesto por tres Trabajos de Fin de Grado que buscan investigar y conocer la epidemiología, la patogenia y el tratamiento de la anaplasmosis ovina. En particular, este estudio comprende la infección experimental de tres animales libres de la enfermedad y su posterior monitorización. La infección se realiza mediante la inoculación de sangre de animales infectados, con una concentración bacteriana conocida, gracias al empleo de una PCR cuantitativa, en tres animales jóvenes, nacidos en la facultad y aislados de cualquier otro patógeno.

Posteriormente, se procede a una monitorización de los animales que consta de una evaluación clínica diaria a lo largo de dos meses, siendo complementada con varios tipos de pruebas laboratoriales: extracción de sangre para valorar los parámetros hematológicos, realización de frotis sanguíneos teñidos con Giemsa para observar formas compatibles y análisis mediante PCR cuantitativa para valorar la evolución de la bacteria en el tiempo dentro del organismo.

Los resultados obtenidos demuestran el desarrollo de la enfermedad y que ésta es transmitida por la sangre. Los animales desarrollan una anemia severa debido a la hemólisis inmunomediada de los eritrocitos y la qPCR ayuda a entender la dinámica y evolución de la bacteria en el organismo. Ésta revela una curva asociada al grado de anemia con un pico en torno al mes de la infección que va decayendo progresivamente, en paralelo a la recuperación de los valores hematológicos por parte de los animales.

**Palabras clave:** *Anaplasmosis ovina; Infección experimental; PCR cuantitativa; Anemia*

## ANAPLASMOSIS IN SEVERAL SHEEP FLOCKS IN THE REGION OF MATARRAÑA (TERUEL)

### Artificial Infection with *Anaplasma ovis*

#### SUMMARY

A clinical case of ovine anaplasmosis was diagnosed in 2014 by the Ruminant Clinical Service of the University of Zaragoza (SCRUM). Subsequently, it was decided to start a research to increase the knowledge about this not-well-known disease. This study is a part of a biggest research formed by other two final degree works. In this study it was developed an experimental infection with *Anaplasma ovis* performed in three free pathogen animals with the objective of monitoring these animals to increase the knowledge about dynamic of infection and pathogenic aspects of ovine anaplasmosis. The experimental infection has been carried out by inoculating blood from infected animals with known bacterial concentration by quantitative PCR test (qPCR).

A daily clinical examination has been done during two months. This information has been complemented with several laboratory test such as hematological analysis, blood smear stained with Giemsa and qPCR test. All this has been done to measure evolution of hematologic parameters and bacterial blood concentration levels.

The results obtained show the development of the disease and that this can be transmitted by blood. Infected animals developed a severe anemia due to immunomediated hemolysis. qPCR test shows a relation between bacteria blood levels and anemia degree. The maximum bacteria concentration is about a month post infection. Subsequently, bacteria levels decline progressively in relation with hematological parameters recovery.

**Key words:** *Anaplasma ovis*; experimental infection; quantitative PCR; anemia

## 1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo ha sido desarrollado en base a un caso clínico recibido en el Servicio Clínico de Rumiantes de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza en el curso académico 2013-14. El caso clínico se describe como un proceso que lleva afectando, desde el año 2010, a varias explotaciones semiextensivas de ovino de la comarca del Matarraña (Teruel). El cuadro descrito por las veterinarias se caracteriza por su inespecificidad, ya que los síntomas observados son debilidad extrema, anorexia y pérdida de peso, aunque también se han observado casos de conjuntivitis, abortos y cojeras. El proceso afecta entre un 2 y un 5% del rebaño, sin embargo, limitando la población de estudio a los animales de entre 1 y 3 años y, principalmente, a las ovejas de primer parto, la morbilidad del proceso aumenta considerablemente, llegando en algunos casos al 50-60%. Cabe destacar que el cuadro no acaba de manera fulminante con la vida del animal, sino que son los propios ganaderos los que deben deshacerse de los animales ante la incapacidad de recuperación de los mismos, rondando el 80% la tasa de desecho de estos animales afectados.

Las necropsias realizadas, tanto en campo como en el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, no son concluyentes para el diagnóstico final, ya que los únicos hallazgos representativos son la dilatación cardíaca y la aplasia medular; esta última debida, posiblemente, a la caquexia que presentan los animales.

Las veterinarias de las Asociaciones de Defensa Sanitaria (ADS) de la comarca detectan que el cuadro se extiende por casi todo el territorio (un 33% de las explotaciones de la zona, 22 afectadas de un total de 66 explotaciones semiextensivas ovinas de Rasa Aragonesa, Maellana y Ojinegra), lo que hace pensar en una enfermedad de carácter infecto-contagioso y no en procesos derivados del manejo, alimentación o de las instalaciones.

En marzo de 2014 son remitidas al Servicio de Clínica de Rumiantes de la Universidad de Zaragoza (SCRUM) tres ovejas procedentes de la zona del Matarraña. Los animales presentan un cuadro de debilidad extrema, anorexia y pérdida crónica de peso. Se trata de tres ovejas con edades comprendidas entre uno y tres años y de la raza Rasa Aragonesa.

Los animales son sometidos a una exploración clínica diaria en la que no se aprecia ningún signo específico de enfermedad: presentan debilidad extrema, caquexia, lesiones orales leves compatibles con Ectima Contagioso y conjuntivitis con epifora. Los animales van sufriendo, de manera esporádica, picos de fiebre, acompañados normalmente de atonía ruminal. Además,

se controla su consumo de alimento diario, pudiéndose observar que no presentan anorexia, como relatan los ganaderos, sino “apetito caprichoso”, puesto que los animales sí que ingieren alimento, pero éste no es siempre el mismo ni su consumo sigue un criterio lógico.

Durante su estancia en el SCRUM son sometidos a numerosas pruebas clínicas complementarias para intentar llegar a un diagnóstico. La sospecha inicial, trasladada igualmente por los veterinarios de la zona, era Agalaxia Contagiosa, que pese a no ser común en este tipo de sistema productivo ni haberse dado nunca en la zona, tenía un fundamento lógico derivado de la sintomatología, concretamente de las conjuntivitis y las cojeras. Para confirmar dicha sospecha se tomaron muestras mediante hisopos de las auriculares, nasales y oculares, líquido sinovial y muestras de aparato respiratorio mediante lavado traqueobronquial. Las muestras fueron enviadas al centro de análisis EXOPOL Autovacunas y Diagnóstico y al Laboratorio de Sanidad Animal del Gobierno de Aragón para la realización de cultivos microbiológicos y técnicas moleculares, principalmente, PCR. Simultáneamente, se realizan semanalmente pruebas complementarias en el Laboratorio de Patología Médica de la Facultad de Veterinaria: sangre entera para análisis hematológicos y suero para la realización de pruebas bioquímicas son extraídos y analizados semanalmente.

Los primeros resultados no fueron esclarecedores, pues el único microorganismo que logró ser cultivado fue *Branhamella ovis*, un patógeno secundario que causa conjuntivitis y las qPCR (PCR a tiempo real) no amplificaron ninguna secuencia compatible con *Mycoplasma agalactiae* ni con *Clamydophila abortus*.

Las hematologías, sin embargo, revelaron una fuerte anemia normocítica y nomrocromica, que fue agravándose con el paso de las semanas y en la bioquímica se observaron las enzimas AST y GGT elevadas, indicadoras de daño hepático y colestasis, respectivamente.

El hallazgo clave, que reorientó el diagnóstico, fue la detección de orina oscura en uno de los animales durante la realización de un urianálisis de rutina. Se comprobó la presencia de hemoglobinuria, bilirrubinuria y proteinuria que, junto al resto de resultados, hicieron pensar en un cuadro de anemia hemolítica. Debido al comportamiento de la enfermedad, a su difusión y a la observación directa en frotis de formas compatibles con patógenos intraeritrocitarios, se tomaron muestras de sangre que fueron enviadas al laboratorio EXOPOL para realizar una qPCR, en busca de la posible presencia de *Anaplasma sp.* y/o Piroplasmas. Los resultados confirman la presencia de *Anaplasma sp.* Diversas PCRs posteriores confirmaron que la especie era *Anaplasma ovis*. Además, muestras enviadas al laboratorio, tanto de los

propios animales de la zona afectados, como de las garrapatas, como de rumiantes salvajes de la zona, confirmaron que en todos los casos se trataba de la misma cepa de *Anaplasma ovis*.

Las bacterias del género *Anaplasma* pertenecen al orden de las Rickettsiales y son agentes intracelulares obligados de enfermedades transmitidas por garrapatas en mamíferos (Hornok, 2007). Concretamente, se trata de un género de alpha-1 proteobacterias, Gram negativas y que se localizan en la membrana de las vacuolas citoplasmáticas de las células sanguíneas (Rar, 2011).

En el año 2001, una reorganización taxonómica del Orden Rickettsiales sustituyó la Familia Ehrlichiae por la Anaplasmataceae. La familia comprende cuatro géneros: *Anaplasma sp.*, *Neorickettsia sp.*, *Ehrlichia sp.* y *Wolbachia sp.* Este cambio atiende principalmente al desarrollo de nuevas técnicas moleculares que han permitido secuenciar el genoma de estas bacterias y una reorganización más certera (Rymaszewska y Grenda, 2008).

Existen seis especies de bacterias del género *Anaplasma sp.*, todas ellas con tropismo por células sanguíneas y transmitidas por garrapatas, que causan enfermedad en mamíferos. *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis* y *A. bovis* son patógenos comunes en rumiantes silvestres y domésticos. *A. platys* es causante de la anaplasmosis en perros y *A. phagocytophilum* afecta a un gran número de especies de mamíferos incluyendo al ser humano, provocando en este la anaplasmosis granulocítica humana (Rar y Golovljova, 2011).

Además de afectar a distintas especies, las bacterias del género *Anaplasma* muestran tropismo por diferentes células sanguíneas. Como ya se ha citado anteriormente, *A. platys* afecta a las plaquetas de los perros; *A. ovis*, *A. marginale* y *A. centrale* infectan los eritrocitos de los rumiantes. *A. marginale* es la causante de la anaplasmosis bovina, aunque también se ha descrito en casos de anaplasmosis ovina subclínica, sin embargo, nunca en asociación a *A. ovis*, que es la otra posible causante de la anaplasmosis ovina, de manera mucho más común (Alessandra y Santo, 2012). *A. centrale* es considerada una especie de muy baja patogenicidad, por lo que ha sido empleada durante muchos años como vacuna viva frente a la anaplasmosis bovina. Finalmente, *A. bovis* tiene tropismo por monocitos y también ha sido descrito como causante de la anaplasmosis bovina.

En la especie que nos ocupa, la bibliografía cita a la anaplasmosis ovina como una enfermedad con mayor significación en países en desarrollo de zonas tropicales y subtropicales, en los que causa pérdidas económicas encubiertas, normalmente en forma de una disminución de la producción, ante la imposibilidad de diagnóstico y de una respuesta terapéutica adecuada

(Kuttler, 1984). Sin embargo, con el avance en las técnicas moleculares de diagnóstico, se ha descrito la enfermedad en muchos países desarrollados, como pueden ser: Estados Unidos, Italia o Hungría (de la Fuente et al., 2002; 2005; Hornok et al., 2007). Varios estudios demuestran, además, que la prevalencia de la enfermedad en la zona mediterránea es importante (Renneker et al., 2013), aunque apenas se diagnostique a nivel de campo. También cabe destacar que la coexistencia de rumiantes salvajes y rumiantes domésticos en un medio templado, favorable para las garrapatas, favorece una alta prevalencia de la enfermedad (de la Fuente et al., 2004; 2007).

Las bacterias del género *Anaplasma* son transmitidas mediante vectores mecánicos y también biológicos, entre los que exclusivamente se han descrito las garrapatas. Algunos estudios han demostrado que existen hasta 19 tipos de garrapatas capaces de transmitir la enfermedad (Kocan et al., 2004).

Los métodos de transmisión mecánica son variados, pero todos se basan en el contacto de sangre de animales infectados con otros sanos. Puede tratarse de material quirúrgico, agujas o insectos hematófagos, como mosquitos o tábanos. La posibilidad de transmisión dependiente de tábanos y mosquitos del género *Psorophora* ha sido descrita principalmente en Estados Unidos (Kocan et al., 2004). Del mismo modo, existen también evidencias en el caso de la transmisión vertical de tipo placenta-feto, si bien ésta solo ha sido demostrada en el caso de *A. marginale* y siempre que el animal gestante se encuentre en la fase aguda de la enfermedad y en el segundo o tercer tercio de gestación (Zaugg, 1990). Esta vía puede tener cierta relevancia, especialmente en zonas en las que la enfermedad es endémica (Rey et al., 2003).

La transmisión biológica se debe a garrapatas de diversos géneros, en función de la localización geográfica y la estacionalidad. En España, ha sido demostrada la presencia de bacterias del género *Anaplasma* en garrapatas de los géneros *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Hyalomma*, *Dermacentor* y *Amblyomma*. La importancia de estos vectores radica en la función de reservorio que pueden ejercer las garrapatas macho, pues pueden vivir hasta 3 años y mantienen la infección de por vida, con la consecuente capacidad de infección continuada, además de en la posibilidad de transmisión transestadial (Kocan et al., 1992).

Tanto adultos, como ninfas, como larvas son capaces de transmitir la enfermedad, aunque no se ha podido demostrar la transmisión transovárica. Cuando una garrapata muerde a un animal infectado, la bacteria llega a su intestino y luego allí, en las garrapatas del género *Dermacentor*, las bacterias se agrupan en las vacuolas de las células endoteliales del intestino



medio, para pasar después a las células musculares del intestino anterior. Finalmente, se desarrollan para dar lugar a la forma infectiva, ya en las glándulas salivales de la garrapata. Las bacterias forman racimos dentro de las vacuolas parasitóforas, en las que se alternan las formas “reticuladas”, que se replican por fisión binaria y las formas “densas”, que son las que acaban en las glándulas salivales y las que son realmente infectivas (Kocan, 1995).

Es entonces cuando la garrapata adquiere la capacidad de infectar a otro hospedador mamífero al morderlo y vehicular las bacterias a la sangre de éste. En otras especies de *Anaplasma*, se ha demostrado que la infectividad por parte de la garrapata se alcanza cuando en sus glándulas salivales hay una cantidad de  $10^6$  microorganismos (Brayton, 2012). Es por esta dosis-dependencia que la transmisión biológica presenta mayor eficacia y por lo tanto, mayor relevancia frente a la mecánica.

Generalmente, esta enfermedad cursa con síntomas clínicos leves debido a su bajo poder patógeno. Las formas agudas de enfermedad se han descrito asociadas a factores de estrés como: co-infecciones (por enfermedades transmitidas por garrapatas como *Babesia ovis*, *B. motasi*, *Theileria sp.*, etc.), temperaturas elevadas, vacunaciones y desparasitaciones, elevada carga parasitaria por garrapatas, movimientos de animales y transporte de largas distancias, pobres condiciones sanitarias, etc., que pueden contribuir a la multiplicación de *Anaplasma* (Renneker et al., 2013).

La infección se hace visible al microscopio a las 2-6 semanas desde la transmisión. Dentro del eritrocito la bacteria se replica por fisión binaria para formar hasta ocho organismos individuales dentro de una vacuola simple (Ristic y Watrach, 1963; Palmer y McGuire, 1984; Ristic y Kreier, 1984), y sale de él utilizando un mecanismo no bien definido, pero aparentemente no lítico, para infectar nuevos eritrocitos. Durante la fase aguda, el número de eritrocitos infectados se incrementa el doble cada 24-48 horas. (OIE art., 2012; Bautista, 1996).

La destrucción de los eritrocitos y la consecuente anemia no son, sin embargo, inmediatas, comenzando a apreciarse cambios notorios en torno a los 20 días. La destrucción de los glóbulos rojos no se debe a la actividad de la bacteria, sino al sistema retículo-endotelial del propio hospedador y no llega hasta que el porcentaje de células infectadas supera un valor relativamente alto.

La fase aguda de la enfermedad se caracteriza por un cuadro de debilidad inespecífico que concurre con depresión, debilidad propiamente dicha, una marcada pérdida de condición corporal, fiebre y una anemia de carácter progresivo, la cual conlleva todas las posibles

complicaciones, como pueden ser abortos, cojeras, etc. No se da hemoglobinemia ni hemoglobinuria, e ictericia no suele aparecer con frecuencia (Bautista, 1996; Kocan et al., 2010; Yasini et al., 2012). El cuadro que presente el individuo afectado depende en gran medida de las condiciones individuales del animal y del estatus sanitario del mismo (Rymaszewska y Grenda, 2008).

La severa anemia hemolítica asociada a esta enfermedad es consecuencia de la 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- $\gamma$ ), 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 epítomos 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). La intensidad de la respuesta celular se correlaciona con el desarrollo de inmunidad frente a la enfermedad, al contrario que la intensidad de la respuesta humoral, que tiene una pobre correlación con el desarrollo de inmunidad. Por tanto, se desconoce con exactitud el papel que juega la respuesta humoral en el desarrollo de la enfermedad, sin embargo, existen antígenos clave de *A. marginale* que estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes, por lo que parece que sí que tiene cierta relevancia (Corona et al., 2004).

Por otro lado, esta anemia, puede ser causante de una insuficiencia hepática, como consecuencia de una hipoxia hepatocelular (Fidalgo Álvarez, 2003). Esto explicaría los parámetros elevados de AST (indicador de daño en la célula hepática) y GGT (trastornos que afectan al drenaje de la bilis), obtenidos en las pruebas bioquímicas.

En el caso de *A. marginale*, se producen picos de hemolisis recurrentes asociados a picos de fiebre en periodos de alrededor de dos meses de forma periódica. El primer pico se produce en el momento de la primera infección y, una vez superada, el animal queda infectado persistentemente. Que el animal supere esta fase depende de la variabilidad antigénica de la bacteria y, con ello, de su capacidad de evasión de la respuesta inmune, debido al enmascaramiento de los antígenos que provocan la intensa hemolisis inmunomediada (Suarez, 2011). Una vez el animal queda infectado crónicamente, cada cierto tiempo se produce un cambio en esos mismos antígenos de membrana que expresa la bacteria, que pasan a ser detectados de nuevo por el sistema inmune del hospedador, produciéndose otro pico de hemolisis similar al de la primera infección, con los consiguientes picos de fiebre y la clínica asociada (Kieser et al., 1990).

La técnica de diagnóstico empleada con frecuencia antes del desarrollo de técnicas moleculares, ha sido la extensión de sangre entera en forma de frotis, en el que se observan en el microscopio óptico vacuolas en el interior de los eritrocitos. La tinción recomendada es mediante el colorante Giemsa al 10% y con esta técnica se pueden llegar a detectar niveles de bacteriemia del 0,1-0,2% (Erik *et al.*, 1989). A diferencia del diagnóstico de *Babesia*, en el que el parásito puede ser encontrado en sangre de capilares, la muestra debe ser obtenida de la vena yugular. *Anaplasma* aparece como un corpúsculo denso y redondeado en el interior de los eritrocitos, con un diámetro aproximado de 0,3-1.0  $\mu\text{m}$ . El porcentaje de eritrocitos infectados varía en función del estadio de la infección y de la severidad de ésta (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 como para detectar la infección (Trueblood y Palmer, 1998).

Otro método de diagnóstico, mucho más caro, es la reproducción de la infección en un animal sano mediante la transfusión de sangre de otro animal infectado (500 ml de un animal esplenectomizado, en el caso de bovinos) y la observación a posteriori de formas compatibles al microscopio.

Actualmente, el método diagnóstico por excelencia es la polymerase chain reaction (PCR) o reacción en cadena de la polimersa, ya que es capaz de detectar infecciones con un mínimo de 0,0001% de eritrocitos infectados. Además, tiene la capacidad de secuenciar y diferenciar la especie de *Anaplasma* presente (OIE *art.*, 2012; Bautista, 1996). En principio se propuso el gen *msp5* como determinante para el diagnóstico mediante pruebas moleculares, ya que está representado en el genoma como una simple copia, altamente conservada entre las cepas de *A. marginale* estudiadas (Martínez *et al.*, 2004). Además, la presencia del gen en todas las especies de anaplasma, incluyendo *A. ovis*, sugiere que este gen es esencial en el ciclo de vida de la bacteria, lo que avala el uso del mismo para el desarrollo de procedimientos de diagnóstico molecular (Visser *et al.*, 1992).

Sin embargo, en la actualidad es el gen *msp4*, responsable de la expresión de una proteína mayor de membrana, el empleado para diferenciar las distintas especies de *Anaplasma* (de la Fuente *et al.*, 2002).

La sensibilidad y la especificidad de la PCR hacen de ella una herramienta muy útil también para la detección de la bacteria en el vector artrópodo, por lo que puede ayudar a la hora de

realizar estudios para conocer la prevalencia global de la enfermedad a nivel de campo (*Stich et al., 1991; Stich et al., 1993*).

Las pruebas serológicas como fijación del complemento y aglutinación en tarjeta, son los métodos más comúnmente utilizados para detectar animales infectados con *A. marginale* en el campo y fueron métodos aceptados para permitir el movimiento de animales a nivel internacional (World Organization for Animal Health, 2000).

Sin embargo, el uso de técnicas de diagnóstico indirecto se ha limitado finalmente al uso de cELISA, hecho que responde a la gran estabilidad que tiene la proteína msp5, presente en todas las especies de anaplasma, lo que permite emplear kits comerciales para una especie en otras. Es el caso de un estudio en el que se testaron estos kits de *A. marginale* en casos de anaplasmosis ovina producida por *A. ovis* (*Scoles et al., 2007*), con buenos resultados. Sin embargo, no se han empleado técnicas para el diagnóstico serológico específico de *A. ovis*. Al existir esta posibilidad de diagnóstico genérico, no existe la posibilidad de distinguir 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.

En lo referente al tratamiento, han sido empleados diferentes productos frente a la anaplasmosis. Anteriormente al dipropionato de imidocarb y las tetraciclinas, fueron empleados productos como los arsenicales, antimaláricos, derivados antimoniales, etc. Con escaso efecto (*Coetzee, 2006*).

Actualmente en España, los fármacos aprobados como tratamiento de la anaplasmosis en el ganado bovino principalmente, son el dipropionato de imidocarb SC a 2,1mg/Kg p.v. en dosis única, y las tetraciclinas, como la oxitetraciclina IM a 20mg/Kg p.v. en dosis única o la clortetraciclina oral junto con el pienso 0,2 a 0,4 g/Kg p.v./día, en 2 dosis, durante 5 a 7 días (*GuíaVet 2013-2014*).

El tratamiento antibiótico de la anaplasmosis es efectivo en una disminución del número de bacterias y una mejora de la sintomatología clínica, pero la eficacia en la eliminación de la infección y evitar que el animal quede como reservorio es variable. Por otro lado, los animales en los que tras un tratamiento se ha conseguido eliminar completamente la infección adquieren inmunidad, por lo que son susceptibles de reinfectarse de nuevo con la cepa original, aunque parece ser que de forma más leve que la primera vez. Además, requiere de largos tratamientos con antibióticos, teniendo en cuenta la problemática que esto conlleva en

lo referente al desarrollo de resistencias, que es una preocupación tanto de salud pública como animal (Suarez, 2011).

Se han realizado numerosos estudios con diferentes quimioterápicos con diversos resultados en relación a la eliminación total de la infección o con, únicamente, una mejora de los síntomas. Entre ellos encontramos tratamientos con Clortetraciclina oral 4,4-22mg/kg/día durante 80 días, obteniendo como resultado la eliminación total del estado de portador (se demuestra por PCR a los 49 días post- tratamiento (Reinbold et al. 2010); mientras que en otros trabajos se analiza el uso de Oxitetraciclina IV 22mg/kg cada 24h durante 5 días (Suarez, 2011) o Enrofloxacin a dosis de 12,5 mg/kg, 2 inyecciones cada 48h durante 6 días, observándose una mejora de la sintomatología, pero sin eliminación de la infección (Coetzee, 2006).

En nuestra opinión, se debe tener en cuenta el tratamiento con doxiciclina, fármaco eficaz de elección para la anaplasmosis granulocítica humana (Chochlaki, 2010), en la anaplasmosis y ehrlichiosis en perros a dosis de 10mg/kg vía oral cada 24h durante 28 días (Little, 2007) y en la infección por *A. platys* en perros (Sainz et al., 1999) para tratar también la anaplasmosis ovina.

Parte del trabajo de investigación desarrollado por nuestro equipo sobre esta enfermedad y que sirvió para la realización de un brillante trabajo fin de grado, corrobora el uso de la doxiciclina en el tratamiento de esta enfermedad.

## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

Una vez alcanzado el diagnóstico del caso clínico que estaba afectando a la comarca del Matarraña, nos encontramos con la enorme dificultad de encontrar información actualizada y útil en la bibliografía sobre la anaplasmosis ovina.

La anaplasmosis ovina es una enfermedad presente, principalmente, en países en desarrollo de zonas tropicales y subtropicales, países generalmente pobres, por lo que no ha sido estudiada con detenimiento. Es cierto, que en la actualidad, debido principalmente al desarrollo de técnicas moleculares de diagnóstico, la enfermedad ha empezado a ser diagnosticada en países Europeos y en Norteamérica y se está comenzando a avanzar en su conocimiento. Sin embargo, todavía es mucha la carencia de información relativa a esta enfermedad. Por otro lado, cabe destacar que se trata de una enfermedad que afecta al ganado ovino y caprino, sector que, tradicionalmente, cuenta con menos recursos que el del vacuno, en el que sí existen un mayor número de estudios sobre el tema.

De modo que, uno de los principales objetivos del trabajo es poder avanzar en el conocimiento de una enfermedad que, por diversas causas, no ha sido estudiada en profundidad y sin embargo, sospechamos que produce importantes pérdidas económicas.

Por otro lado, desde que fue diagnosticado el caso clínico, nos han ido llegando casos remitidos de toda la geografía española, por lo que parece que nos enfrentamos a un problema más amplio, que supone importantes pérdidas económicas en las explotaciones afectadas y que, probablemente, esté en expansión en estos momentos. De modo que, desde la Universidad debemos de tratar de proporcionar al sector ovino, tanto a ganaderos como a veterinarios, las armas necesarias para combatir esta enfermedad.

Es por todo ello que, desde el Servicio Clínico de Rumiantes, se propuso la realización de tres estudios paralelos con el fin de profundizar en el conocimiento de la enfermedad. Estos estudios se concretan en tres Trabajos fin de Grado y son los siguientes: un estudio epidemiológico en la comarca afectada, la infección experimental de unas corderas libres de la enfermedad y un ensayo clínico de tratamiento con doxiciclina con diferentes pautas terapéuticas.

El objetivo del presente trabajo será tratar de reproducir la enfermedad experimentalmente en corderas libres del patógeno para monitorizar la evolución de la misma y aprender de ese modo, un poco más, acerca de la patogenia de la enfermedad y la respuesta del hospedador ante la misma.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

El siguiente estudio experimental ha sido aprobado por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad de Zaragoza.

Como el objetivo del presente trabajo era reproducir la enfermedad mediante una infección experimental, necesitábamos contar con animales libres del patógeno y ovejas donantes infectadas de manera natural.

#### ***Ovejas donantes***

Previamente a la infección experimental, se determinaron los animales donantes, que eran las ovejas con el número de crotal 76310 y el 39367, animales enfermos y positivos por PCR a *Anaplasma ovis*, pertenecientes a otro de los estudios desarrollados sobre anaplasmosis, el que aborda el ensayo clínico de tratamiento con doxiciclina. Estos animales presentaban en los resultados de la qPCR una Cq de 24,3 y 23,8 respectivamente, lo que supone una carga

bacteriana en sangre de  $8,35 \times 10^6$  y de  $1,18 \times 10^7$  copias de *Anaplasma ovis* por mililitro, en cada uno de ellos. Se trataba de animales procedentes de una explotación con clínica compatible con la enfermedad y localizada en la comarca afectada, a los que se les realizó una qPCR para determinar la dosis infectante.

### **Corderas**

Los animales elegidos para el experimento fueron tres corderas nacidas en el Servicio Clínico de Rumiantes, las cuales fueron mantenidas en un box, en aislamiento de otros animales, para mantenerse así libres de cualquier enfermedad que interfiera en la prueba. La alimentación durante todo el periodo experimental se basó en pienso concentrado y paja ad libitum y los animales fueron explorados periódicamente para asegurar la ausencia de cualquier enfermedad.

En el mes de octubre de 2014, con vistas a la realización de la infección experimental, se extrajo sangre de las corderas, la cual fue almacenada en tubos con EDTA para su posterior diagnóstico molecular. Los tres animales fueron diagnosticados como negativos a *Anaplasma ovis* mediante la técnica qPCR, realizada por los laboratorios EXOPOL Autovacunas y Diagnóstico. En el momento de la realización de la infección experimental, los animales tenían entre 10 y 11 meses de edad y estaban identificadas mediante los crotales individuales: 126, 127 y 128. A su vez, se tomó una muestra de sangre inmediatamente anterior a la realización de la infección experimental para comprobar que los animales seguían siendo negativos al inicio del ensayo.

### **Diseño Experimental**

A la hora de realizar el experimento y establecer el seguimiento de los animales, se tomaron como referencia dos ensayos clínicos realizados para evaluar la respuesta de animales a una infección experimental con *A. ovis* (Yasini et al., 2012; Ciani et al., 2013). En el experimento realizado por Yasini et al., en 2012, se infectaron 20 animales de entre 5 y 6 meses para la posterior monitorización de diversos parámetros, tanto clínicos como laboratoriales. A diferencia del presente estudio, la PCR realizada en su trabajo no permite distinguir la especie de *anaplasma* que está presente. En el trabajo realizado por Ciani et al., en 2013, realizan la infección de corderos de 6 meses de distintas razas y valoran parámetros hematológicos y clínicos, únicamente. En ambos casos, la sangre procede de animales esplenectomizados, que aporta mayor fiabilidad a la hora de conocer la carga bacteriana, ya que en estos animales, la carga bacteriana en el torrente circulatorio es más estable debido a que no se produce su destrucción en el bazo. En el presente estudio, este hecho se subsana gracias al empleo de PCR

cuantitativa a la hora de seleccionar las donantes, ya que con esta técnica conocemos con seguridad la carga infectiva de los animales.

### ***Infección experimental y corte de colas, 19 de mayo de 2015***

Antes de realizar la transfusión de sangre infectada, se les realizó a los animales una breve intervención quirúrgica para realizar el corte de la cola, práctica habitual en las explotaciones ovinas españolas. Esta intervención se realizó para someter a los animales a un factor de estrés ya que, tanto nuestra experiencia a nivel de campo, en la que se asocia el desarrollo de la enfermedad en el momento en el que se somete al animal al estrés del primer parto, como aparece citado en la bibliografía, se demuestra la importancia de los factores estresantes como determinantes en el desencadenamiento del cuadro clínico (*Bautista 1996; Yasini et al., 2012; Renneker et al., 2013*).

Para la realización de la intervención quirúrgica sedamos a cada animal con 0,5 ml de xilacina (Xilagesic<sup>®</sup>) intravenosa y después depilamos la parte ventral del cuello y toda la parte proximal de la cola, tanto en el lugar donde realizaremos la anestesia epidural como en la zona de sección. La anestesia se realiza con 1 ml de anestésico local, concretamente lidocaína (Xilocaina<sup>®</sup>), entre la primera y la segunda vertebrae coccígeas.

Para la realización de la transfusión de sangre de las ovejas donantes a las corderas mezclamos sangre de los dos animales, concretamente, 45 ml de cada uno de ellos, que introducimos en una jeringa de 100 ml que contenía 20 gotas de heparina para evitar su coagulación. Después, dividimos esos 90 ml en tres alícuotas e introducimos 30 ml en cada uno de los tres animales, en el momento que realizamos el corte de colas. Teniendo en cuenta que la dosis infectiva necesaria para producir la enfermedad de manera natural es de  $10^6$  bacterias (*Brayton, 2012*), la elección de la cantidad de sangre administrada tiende a superar con holgura dicha cantidad, para asegurarnos la infección y a la cantidad elegida en estudios similares que varía entre 20 y 25 ml por animal (*Yasini et al., 2012; Ciani et al., 2013*).

Pese a que en los dos ensayos de infecciones experimentales con *Anaplasma ovis* la sangre donante provenía de animales previamente esplenectomizados, no pudo ser posible en este caso debido a la falta de medios y a que dichos animales debían pasar después a formar parte del estudio sobre el ensayo clínico de tratamiento con doxicilina.

### ***Evaluación clínica***

Una vez completada la infección, se llevó a cabo una monitorización diaria de los parámetros clínicos de los animales, con el fin de valorar su evolución. Diariamente, durante



aproximadamente dos meses, se realiza una exploración física general y se registran una serie de parámetros clínicos: condición corporal, temperatura, coloración de las mucosas, frecuencias respiratoria y cardíaca, valoración del tamaño de los linfonodos y auscultación de los movimientos ruminales por minuto.

Los animales fueron pesados también periódicamente para valorar la posible pérdida de peso en los días 11, 25, 39 y 53 post-infección.

### ***Evaluación laboratorial***

Se tomaron muestras de sangre entera con EDTA y de suero de forma seriada tras la infección: los días: 0, 4, 8, 12, 16, 23, 30, 37, 44, 51, 58, 67, 86, 100, 114 y 143. Se tomó sangre entera tanto para la realización de hematología como de qPCR y, a su vez, se congeló suero con vistas a una posible determinación posterior de anticuerpos.

Las hematologías fueron realizadas en el Laboratorio de Análisis Clínico de la unidad de Patología General y Médica de la facultad, en un Contador Hematológico Vet-ABC de la empresa DIVASA FARMAVIC, SA.

La qPCR fue realizada por los laboratorios EXOPOL mediante el siguiente protocolo:

La extracción del ADN se realiza utilizando un equipo de extracción automática de ácidos nucleicos "LABTURBO 48C" de la casa TAIGEN Co. y utilizando el kit comercial Labturbo DNA Mini kit 480 de la misma compañía.

Esta PCR tiene como gen diana el *msp4* de *Anaplasma ovis* y tiene una sensibilidad de 50 copias/rxn (límite inferior de cuantificación). La especificidad ha sido evaluado con otros hemoparásitos como *Theileria annulata*, *Babesia bigémina* y un panel de Anaplasmas (*A. marginale* y *A. phagocytophilum*) para los cuales ha dado resultados negativos. El ensayo de *A. ovis* lleva incluido un control endógeno que permite la identificación de un gen housekeeping presente en rumiantes; este control endógeno ha sido validado para su uso en diferentes muestras de rumiante, incluida la sangre. Como control positivo se utiliza un oligonucleótido sintético del gen diana que incluye los sitios de unión de los oligos y sonda del ensayo. Este control positivo sintético está cuantificado en 5.00E+06 copias/rxn. El uso de una curva estándar con diluciones decimales del control positivo cuantificado permite determinar el número de copias de *A. ovis* presente en la muestra problema.

A su vez, en cada toma de sangre se realizaron extensiones de sangre entera y posterior tinción con Giemsa al 10% para la visualización de formas compatibles al microscopio,

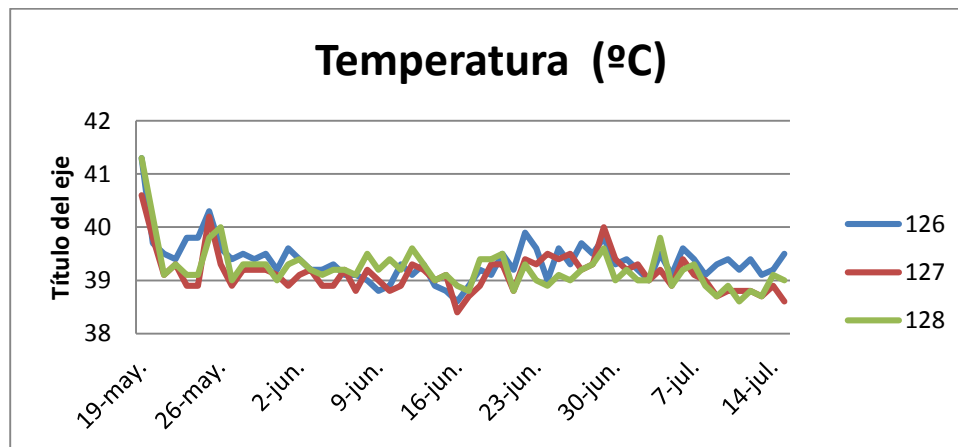
empleando el objetivo de inmersión (x100 aumentos), y con panóptico rápido para el recuento diferencial de leucocitos. La tinción con Giemsa se realiza fijando la muestra, una vez seca, con metanol durante unos 7-8 minutos, para después verter sobre ella 5 ml del colorante diluido en agua destilada. La muestra ha de estar 20-25 minutos bajo el efecto del colorante. Posteriormente, se aclara con agua de grifo y se seca.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### *Resultados de la evaluación clínica*

En la evaluación clínica de las corderas de experimentación realizada diariamente, los animales mostraron signos de infección durante toda la semana inmediatamente posterior a la infección experimental. Se pudo observar un decaimiento general de su estado, además de fiebre durante los primeros dos días y a los 7 días post infección (Gráfica 1). Este empeoramiento drástico no creemos que se deba tanto a la propia clínica asociada a la bacteria como al estrés generado con la cirugía y manejo.

Además, se observaron ligeros picos de aumento de la temperatura, que no llegan a ser febriles, a lo largo de los dos meses de exploración clínica, pero en ningún caso comparables a los descritos en la literatura propios de la infección con *Anaplasma marginale*, claramente marcados y espaciados en intervalos más o menos regulares (*Suarez, 2011*).



Gráfica 1: Evolución de la temperatura corporal de los tres animales a lo largo del estudio.

En la valoración de la coloración de la mucosa de la conjuntiva, se pudo apreciar un aclaramiento progresivo, más marcado a partir del día 14 post-infección, siguiendo la línea de otros artículos en los que detecta la anemia en las mucosas en torno a los 12-23 días (*Yasini et al., 2012*).



Imagen 1

Imagen 2

Diferencia en la coloración de la mucosa conjuntival entre el día 6 post-infección (Imagen 1) y el día 44 post-infección (Imagen 2).

Contrariamente a nuestra experiencia adquirida en los casos de campo, los animales no adelgazaron durante la prueba, sino que incluso llegaron a ganar peso; desde el día 0 de la infección hasta el día 53 post-infección, todos los animales aumentaron entre tres y cuatro kilogramos su peso.

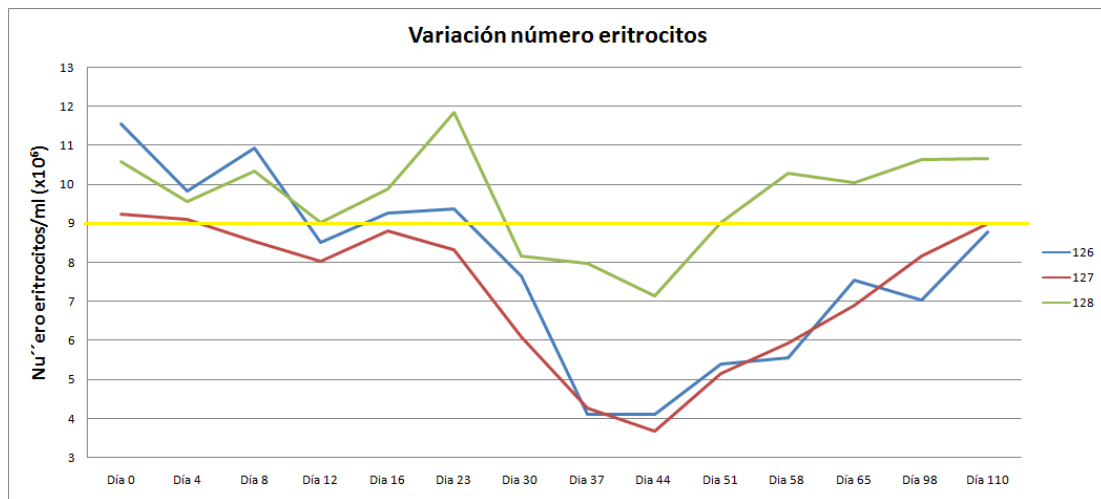
Basándose exclusivamente en los resultados observados en la exploración clínica diaria, se extrae la conclusión de que estos animales, mostrando esta clínica tan leve, en el campo pasarían completamente inadvertidos para el ganadero, puesto que no desarrollaron ninguno de los síntomas más graves en los que puede incurrir un cuadro de anaplasmosis ovina. No presentaron picos de fiebre muy marcados ni pérdida de lana, hecho que sí que podría observarse en condiciones de campo, ni tampoco una pérdida de condición corporal de ningún tipo, que es el signo principal de la enfermedad junto al decaimiento del estado general de salud del animal.

Hay que destacar también que, en base a lo aprendido en estos años de estudio, podemos decir que las condiciones en las que ha sido desarrollado el estudio pueden tener mucha influencia en el desarrollo o no de la enfermedad por parte del animal. Los animales estuvieron estabulados durante todo el estudio, con un buen nivel de alimentación y sometidos a un estrés mínimo, salvo el derivado de las exploraciones físicas diarias. Sin embargo, estos mismos animales, alojados en cualquier explotación de la comarca, serían sometidos a un manejo con muchos otros factores de estrés, empezando por las salidas a pasto, posibles reinfecciones, cubrición y parto, etc. Actuaciones que podrían, probablemente, comprometer la respuesta inmune del animal y desencadenar el cuadro clínico asociado.

**Evaluación laboratorial**

Al contrario de lo que sucede en la evaluación clínica, en este apartado sí que se observan cambios notables en el estado del animal y que se pueden asociar a la presencia del germen.

Los resultados de las hematologías (Gráfica 2) revelan el desarrollo en el tiempo de una anemia muy severa que comienza a detectarse en el día 8 post infección, en el animal 127, y en el día 12, en el animal 126, que comienzan mostrando una anemia leve, con valores de número de eritrocitos/ml de  $8,55$  y  $8,51 \times 10^6$  eritrocitos/ml, siendo el límite inferior que determina la anemia  $9 \times 10^6$  eritrocitos/ml. Tras esos días en los que los animales sufren esta ligera anemia, retoman de nuevo valores normales en la hematología hasta el día 30 post-infección, en el que los tres animales caen por debajo del límite fisiológico y comienzan a mostrar una marcada anemia. La concentración de eritrocitos sigue cayendo durante dos semanas, hasta el día 44 post-infección en el que hay valores de anemia muy graves: el animal 126 presenta un valor de  $4,11 \times 10^6$  eritrocitos/ml, el 127,  $3,67 \times 10^6$  eritrocitos/ml y el 128, que sufre un cuadro más leve, se queda en  $7,15 \times 10^6$  eritrocitos/ml. El animal 128, que no muestra el primer pico de anemia (día 12), también sufre con menor gravedad el segundo y llega a recuperar valores normales al día 51 post-infección, mientras que los otros dos animales siguen en valores de anemia severos hasta el día 65 post-infección y no recuperan valores normales hasta la última toma de muestras, en el día 113.



Gráfica 2

La gráfica muestra la variación en el número de eritrocitos por ml en los tres animales del estudio durante 110 días. La línea amarilla marca el rango de normalidad.

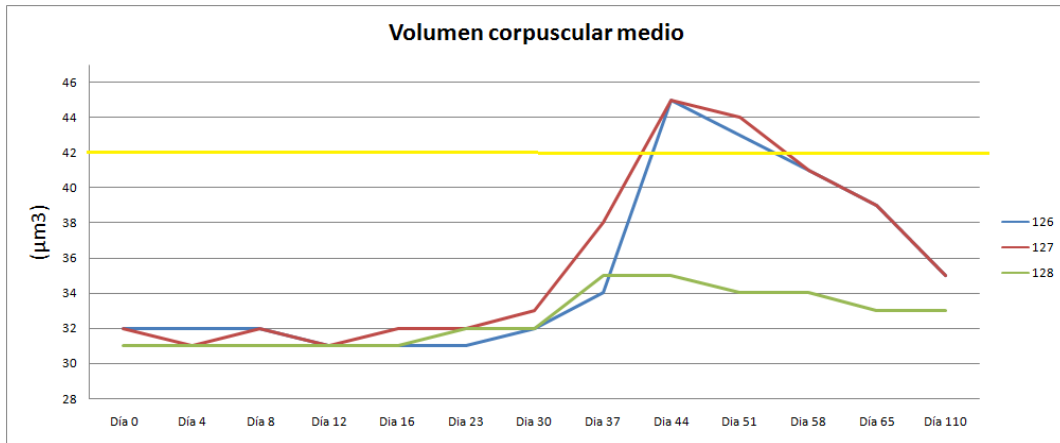
Frente a otros estudios, en los que el pico de anemia se produce mucho antes, en torno al día 15 post-infección (*Yasini et al., 2012*), en este caso el pico se produce al mes de la infección.

Sin embargo, en consonancia con lo expuesto en el estudio de Yasini (2012), el nivel de eritrocitos/ml decae progresivamente desde casi el momento mismo de la infección.

Finalmente, y sin la aplicación de ningún tratamiento, todos los animales recuperan los valores normales, aunque el 126 y el 127 tardan aproximadamente 4 meses, mientras que el 128 tan sólo dos meses. La capacidad de recuperación por si mismos de los animales afectados ha sido también descrita en la bibliografía, *Ciani et al., en 2013* dicen que los animales pueden sobrevivir a la fase aguda y algunos pueden llegar a superarla sin necesidad de tratamiento. De esta información se puede extraer que el cuadro de la enfermedad es lento e insidioso, pese a la virulencia con la que se infecta a los animales, el pico de anemia y la recuperación de valores normales en la hematología se producen en periodos de tiempo muy prolongados. Esta recuperación puede deberse en gran medida, a un buen manejo basado en la separación de estos animales en un box diferente respecto del resto del rebaño, al aporte de una alimentación de calidad, reposo, al evitar situaciones estresantes y al mantenimiento de unas buenas condiciones higiénico-sanitarias.

No se observó en ningún momento hemoglobinuria asociada a la intensa hemólisis que se estaba produciendo, por lo que se puede deducir que la lisis de los eritrocitos no es intravascular sino que, como cita la bibliografía (*Bautista, 1996; Yasini, et al., 2012*), los anaplasmas no lisan los eritrocitos, sino que es el propio sistema inmune del animal el que, mediante procesos de opsonización y fagocitosis asociados, destruye los hematíes provocando la anemia.

El VCM (volumen corpuscular medio) y la CMHC (concentración media de hemoglobina corpuscular) sufren también variaciones a lo largo de toda la infección. Ambos parámetros hematológicos ayudan a indicar la evolución del tipo de anemia sufrida por los animales, que, según cita la bibliografía y basándonos también en nuestra experiencia clínica, es de tipo normocítico y normocrómico (*Yasini et al., 2012*).

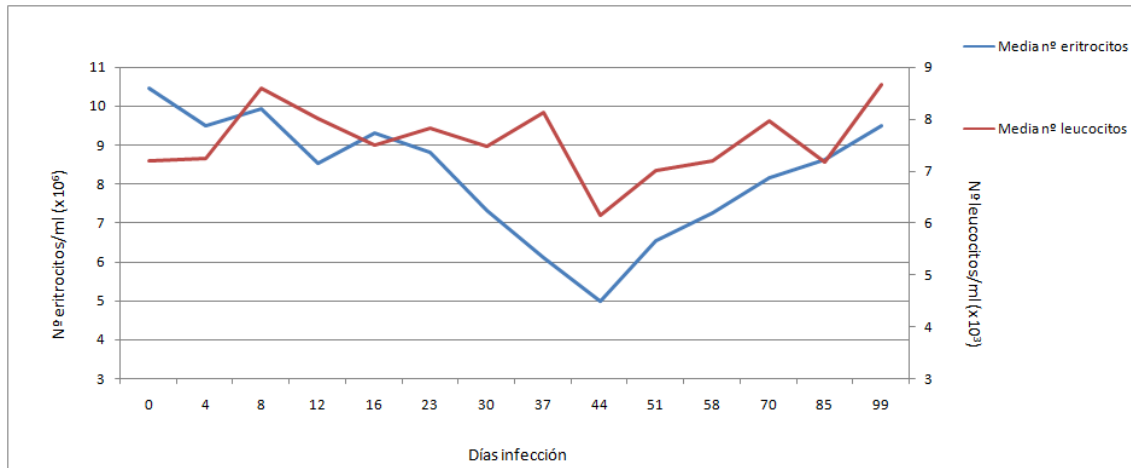


**Gráfica 3**

La gráfica muestra la variación del volumen corpuscular medio en el tiempo. La línea amarilla indica el límite superior del valor normal ( $42 \mu\text{m}^3$ ).

El VCM, indicativo del tamaño de los eritrocitos, aumenta por encima de valores normales en los dos animales con un nivel de anemia más severo (Gráfica 3), indicando una respuesta regenerativa intensa, de tipo macrocítico, ya que los reticulocitos, precursores de los eritrocitos, son de mayor tamaño. Por lo tanto, estos animales sufren una anemia de tipo normocítico y normocrómico en un principio, que pasa más tarde a macrocítica y normocrómica, es decir, existe una respuesta regenerativa del organismo para combatir la anemia. Este pico en el tamaño de los eritrocitos se produce una semana después del pico máximo de anemia y disminuye a la vez que el animal recupera el número de eritrocitos, con esa diferencia de una semana. Esa diferencia de una semana entre el grado máximo de anemia y el pico del VCM también se ha observado en la infección experimental realizada por Yasini et al. en 2012, aunque en ese caso, los picos se producen entre 15 y 20 días antes.

En el caso del animal 128, la anemia es igualmente normocítica y normocrónica al principio, pero su respuesta regenerativa no es igual a la de los otros animales, ni a la observada en otros estudios (*Cianiet al., 2013; Yasini et al., 2012*), en los que la respuesta es siempre macrocítica. En este caso, el tamaño de los eritrocitos no varía, su VCM se mantiene en valores normales, pero su CMHC está aumentado, lo cual supone que la anemia es normocítica e hiperocrómica. La hiperocromía suele estar asociada a cambios macrocíticos en la serie roja, aunque no es así en este caso, lo que se puede deber a que el pico anémico es mucho menos marcado y la respuesta del organismo para compensar la anoxia se basa tan solo en un aumento de la concentración de hemoglobina y no en la producción de reticulocitos.

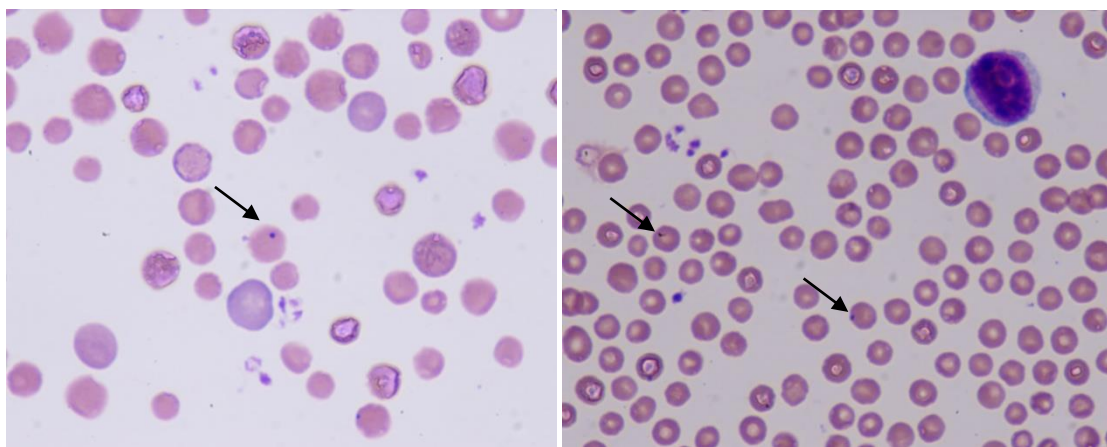


**Gráfica 4**

La gráfica muestra la relación entre la media del número de eritrocitos por ml de las tres ovejas y la media del número de leucocitos.

En cuanto a la serie blanca, el número total de leucocitos disminuye paralelamente al de eritrocitos (Gráfica 4), pero en ningún momento llega a caer por debajo del límite inferior del rango de normalidad, lo que supondría un estado de leucopenia. Tampoco existen cambios representativos en el recuento diferencial de leucocitos. De cualquier modo, para cuantificar el papel de la respuesta inmune en el proceso, se deberían recurrir a técnicas específicas para detectar interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) e inmunoglobulinas IgG2, que se sabe tienen un papel vital en la lisis de los eritrocitos en otros tipos de anaplasmosis (*Brown et al., 1998*).

Por otro lado, en la observación directa al microscopio de las preparaciones de sangre entera teñidas con Giemsa, se observan formas compatibles con *Anaplasma ovis* dentro de los eritrocitos (Imágenes 3 y 4). En la imagen se puede detectar una esfera de color azul oscuro, en posición central o marginal que no tiene refringencia.



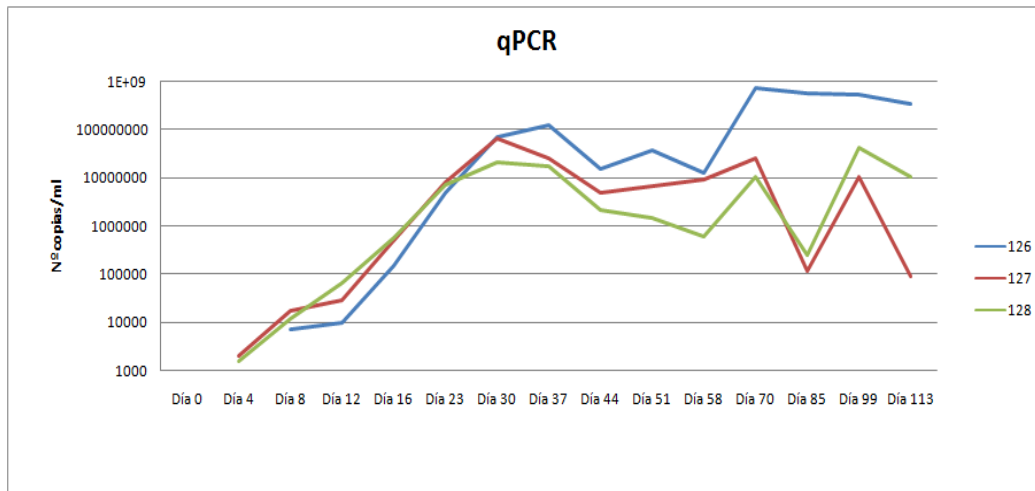
**Imagen 3**

**Imagen 4**

Las imágenes muestran dos capturas de distintos campos en frotis con tinción Giemsa a 100 aumentos. Las flechas indican las posibles formas compatibles con el patógeno

**Resultados PCR cuantitativa**

El análisis molecular de las muestras tomadas también arroja resultados interesantes. Al ser la técnica de PCR empleada de tipo cuantitativo, pudimos establecer una curva en la que se ve el aumento de la presencia de bacterias de anaplasma en sangre según avanzan los días postinfección. Esta curva es fácilmente asociable a la variación de los parámetros hematológicos explicada anteriormente.



Gráfica 5

La gráfica muestra la evolución de la concentración de bacterias (en copias/ml) en sangre a lo largo de todo el proceso.

Dos de los animales resultan ya positivos a la qPCR el día 4 post-infección (127 y 128), mientras que el otro, el 126, no lo es hasta el día 8. Estos datos coinciden con los ofrecidos en el trabajo realizado por *Ciani et al.* en 2013, en el que se describe la aparición de la bacteria a los 7 días de aparecer el primer pico de fiebre, indicativo del comienzo del proceso. A partir de entonces, nuestros animales sufren un incremento progresivo hasta alcanzar el pico de bacteriemia, que se da en el día 30 en los animales que mostraron positividad primero y una semana más tarde en el 126. En otros trabajos, el pico se alcanza antes, en el día 12 post-infección, pero la valoración que hacen de la presencia de la bacteria es mediante la visualización y contaje en preparaciones con Giemsa (*Yasini et al., 2012*), siendo la técnica de qPCR mucho más ajustada.

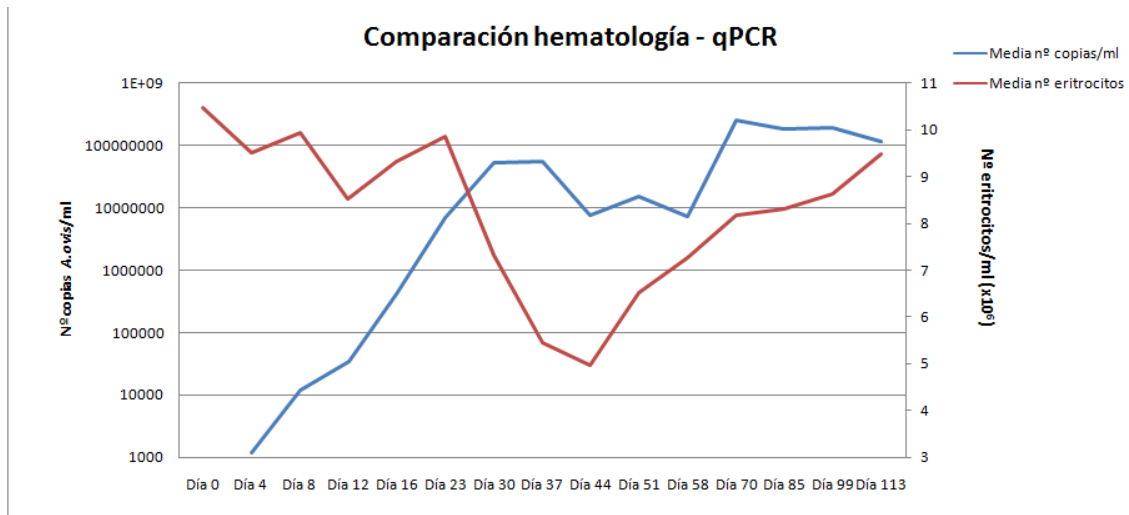
A partir del pico de bacteriemia, la concentración de bacterias en sangre disminuye gradualmente, hasta el día 70, en el que los tres animales muestran una reactivación, otro pico de bacteriemia, que es superior al primero en el caso del animal 126 y muy similar en el caso de los otros dos (127 y 128). Este aumento está claramente relacionado con la carga bacteriana del primer pico, puesto que el animal con mayor cantidad de bacterias por ml es el que sufre el repunte más alto. Según cita la bibliografía (*Kieser et al., 1990*), en el caso de *Anaplasma marginale*, se observan estos picos repetidos de bacteriemia, pero van unidos



siempre a picos de anemia y fiebre. En nuestro caso, pese a aparecer un segundo pico de bacteriemia tan intenso como el primero, éste no produce ninguna clínica asociada, ni tampoco cambios en los valores hematológicos.

La progresión que sufre la bacteria dentro del organismo de los animales es logarítmica, es decir, la bacteria aumenta su concentración en sangre una unidad logarítmica en cada muestreo, hasta alcanzar el pico máximo. En principio, existe una concentración del orden de 2000 o 3000 bacterias por ml de sangre, que se va multiplicando por 10 cada 4 días, hasta alcanzar un número de bacterias de entre 10 y 100 millones por ml de sangre. Esto supone un aumento mucho mayor que el citado en la bibliografía, en la que se habla de una duplicación del número de bacterias cada 24h (OIE art., 2012; Bautista, 1996).

La visualización directa en frotis de formas compatibles es la técnica empleada en las otras infecciones experimentales realizadas con *Anaplasma ovis* (Ciani et al., 2013; Yasini et al., 2012). En estos trabajos, se observan entre un 0,2% y un 1,44% de eritrocitos en cuyo interior se aprecian formas compatibles, pero no se cuantifica a la bacteria, ya que ésta se encuentra en el interior de vacuolas parasitóforas (Ristic y Watrach, 1963; Palmer y McGuire, 1984; Ristic y Kreier, 1984). En la visualización de frotis en este estudio, también se observaron formas compatibles, pero se decidió no emplear la prueba como método cuantitativo de diagnóstico de la enfermedad por su falta de especificidad y porque contábamos, en este caso, con una técnica mucho más apropiada. La presencia de formas compatibles solo fue observada en el caso de las muestras tomadas en los días próximos al pico de bacteriemia, en el que había una concentración conocida del orden de  $10^7$ - $10^8$  bacterias por ml. Sin embargo, no parece haber una correlación directa entre la presencia de formas compatibles y la cantidad de bacterias, ya que, pese a observarse dichas formas compatibles, estas no aparecen en valores cercanos a los obtenidos en los anteriores estudios (cercaos al 1,5% de eritrocitos infectados), ni se pueden observar en otras muestras en las que la concentración de bacterias es igualmente elevada. Este hecho podría achacarse a la falta de experiencia en el visionado de estas formas en las preparaciones con Giemsa, sin embargo, y pudiendo hacer uso de la qPCR, una prueba con mayor especificidad y sensibilidad, el uso de la observación directa de frotis al microscopio para el diagnóstico de la enfermedad tiene más interés desde el punto de vista cualitativo, para determinar positividad-negatividad, que desde el punto de vista cuantitativo.

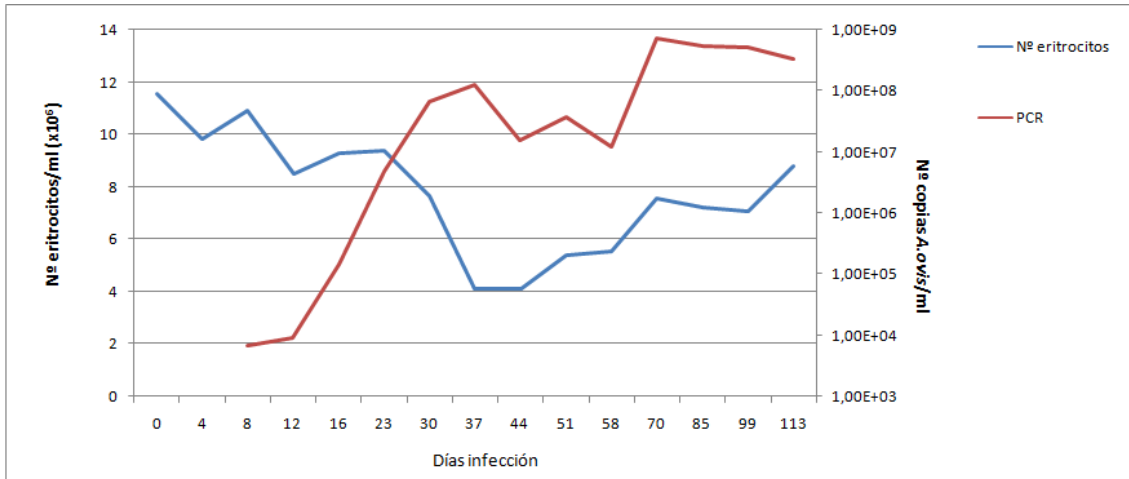


**Gráfica 6**

La gráfica muestra la relación entre la variación en la media de eritrocitos por ml de sangre de los tres animales con la media de la concentración de bacteria en sangre (copias/ml)

Si se comparan los resultados de la qPCR con los obtenidos en los análisis hematológicos (Gráfica 6), se puede observar una separación de una semana entre el pico de anemia y el pico de bacteriemia. El máximo grado de anemia se localiza entre los días 37 y 44, es decir, una semana después del primer pico de bacterias en sangre. Esta diferencia se debe a que la hemólisis no es inmediata, sino que está asociada a la respuesta inmune del animal. Se puede observar que, en el segundo pico de bacteriemia, más alto que el primero, los niveles hematológicos medios siguen con su recuperación, por lo que se deduce que la respuesta regenerativa del organismo es suficiente para compensar la hemólisis o que ésta no es tan intensa la segunda vez.

Merece la pena destacar la progresión sufrida por el animal 126 (Gráfica 7). Se puede observar cómo, tras superar el primer pico de la infección, el nivel de bacterias en sangre cae hasta valores del orden de 10<sup>7</sup> bacterias/ml, en el día 58 post-infección y, 12 días más tarde, en el día 70, el número de eritrocitos ha aumentado hasta casi 8x10<sup>6</sup>, casi rozando valores normales. Sin embargo, se produce otro pico de bacteriemia en sangre en ese mismo día, que corta con la progresión al alza de los valores hematológicos, que vuelven a caer hasta 7x10<sup>6</sup> eritrocitos/ml. Este nuevo pico de infección ha producido de nuevo un descenso del número de eritrocitos agravando la anemia, sin embargo, ha sido un empeoramiento mucho más leve que tras el primero. El animal recupera antes la tendencia positiva y no presenta sintomatología alguna. El por qué se produce una respuesta menos intensa por parte del sistema inmune en el segundo pico es algo que debe ser sometido a estudio.



Gráfica 7

La gráfica muestra la relación entre el número de eritrocitos y la cantidad de copias de *A. ovis* por ml de sangre en el animal 126.

En el caso de *A. marginale*, estos picos recurrentes se deben a su gran variabilidad antigénica que hace que el sistema inmune reaccione de manera violenta cada vez que se producen dichos cambios (Kieser et al., 1990)., sin embargo, en este caso, el sistema inmune reacciona de manera menos intensa, provocando una anemia mucho más leve.

## 5. CONCLUSIONES

Las conclusiones extraídas del presente estudio se citan a continuación:

- Con una concentración bacteriana de  $8,35 \times 10^6$  y de  $1,18 \times 10^7$  copias de *Anaplasma ovis* por mililitro de sangre de ovejas donantes pudo ser reproducida la enfermedad experimentalmente en corderas libres del patógeno.
- La presencia de la bacteria en sangre se relaciona con la aparición de una grave anemia, que acaba siendo superada de forma natural por el animal gracias a una intensa respuesta regenerativa, sin embargo, esto no determina la presencia de signos clínicos detectables de enfermedad.
- Los animales infectados, mantenidos en unas buenas condiciones de bienestar y alimentación, son capaces de superar la infección por ellos mismos de manera natural. Sin embargo, a pesar de la completa recuperación de los parámetros hematológicos, continúan siendo positivos a la qPCR, quedando como portadores asintomáticos de la infección.

- Tras el primer contacto con la bacteria, parece que en reinfecciones sucesivas, el organismo no reacciona de una manera tan exacerbada y no se produce esa grave anemia inmunomediada.

## CONCLUSIONS

The conclusions drawn from this study are cited below:

- With a bacterial concentration of  $8.35 \times 10^6$  and  $1.18 \times 10^7$  copies of *Anaplasma ovis* per milliliter of blood from donor sheep, the disease could be experimentally reproduced in the free-pathogen lambs.
- The presence of bacteria in the blood is related to the presence of a severe anemia, that just being overcome naturally by the animal through an intense regenerative response, however, infection does not determine the presence of detectable clinical signs of disease.
- Infected animals, kept in good conditions of welfare and food, are able to overcome the infection by themselves in a natural way. However, despite of the complete recovery of the hematological parameters, they continue being positive to the qPCR, as asymptomatic carriers of infection.
- After the first contact with the bacteria, in a subsequent reinfection, the body does not react in a manner so exacerbated and does not appear that severe anemia.

## 6. VALORACIÓN PERSONAL

Este trabajo me ha ayudado a entender muchas cosas ajenas a la propia enfermedad, pero la que más importante me parece es el comprobar que la falta de medios se puede suplir con trabajo y la ayuda de muchas personas. El estudio, evidentemente, tiene muchas carencias. Unas son derivadas directamente de la falta de medios y otras, de mi desconocimiento tanto de la enfermedad como de la metodología de trabajo científica. Sin embargo, he adquirido la conciencia de que para aprender sobre un tema, y más sobre un tema tan poco estudiado, el camino a seguir es el del error constante y la revisión. Cuanto más he aprendido de la enfermedad, más y más dudas me han surgido, más afinamientos hubiera hecho en el trabajo, pero supongo, que como todo, es parte de mi aprendizaje.

Por último, solo quiero agradecer a todo el mundo que ha colaborado conmigo en el trabajo. En especial a mi tutora y su infinita paciencia, la Dra. Delia Lacasta, pero también a todo el departamento de Patología Médica, a las veterinarias de las ADS locales, a los laboratorios EXOPOL por la cantidad de trabajo que les he dado, a mis compañeros de los otros dos TFG

sobre la anaplasmosis y a más gente que supongo no habré nombrado. Como nota positiva, además de todo lo que he aprendido ajeno a la enfermedad, es que espero que esta información sea de verdad útil en un futuro para el avance en el conocimiento de este problema y, en especial, para poder encontrar una buena solución para la anaplasmosis ovina.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Alessandra, T., & Santo, C. (2012). Tick-borne diseases in sheep and goats: Clinical and diagnostic aspects. *Small Rum Res*, 106(SUPPL.), S6–S11.
- Bautista G. (1996). La respuesta inmune celular en anaplasmosis bovina. *Ciencia Veterinaria*, 7(24), 315–329.
- 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* outermembranes and protected against homologous challenge. *Infect.Immun.* 66, 5406–5413.
- Brayton, K. A. (2012). Transmisión de *Anaplasma marginale* por garrapatas. *Rev Mex Cienc Pecu* 2012;3 (Supl 1): 41- 50.
- Ciani, E., Alloggio, I., Petazzi, F., Pieragostini, E., (2013). Looking for prognosticators in ovine anaplasmosis: discriminant analysis of clinical and haematological parameters in lambs belonging to differently susceptible breeds experimentally infected with *Anaplasma ovis*. *Acta Vet Scand.* 2013 Sep 22;55:71. doi: 10.1186/1751-0147-55-71.
- Chochlaki, D., (2010). Human Anaplasmosis and *Anaplasma ovis* variant. *Emerg Infect Dis.* 2010 Jun; 16(6): 1031–1032.
- 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.
- Corona, B.; Rodríguez, M.; Martínez, S, (2004). Anaplamosis bovina (bovine anaplamosis). *Rev. Electrón. Vet.* VI:1-27.
- De la Fuente J., Garcia-Garcia J.C., Blouin E., Saliki J.T., Kocan K.M. (2002): Infection of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of the intracellular *Anaplasma marginale* excludes infection with other genotypes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9, 658–668.
- De la Fuente, J.(2004). *Anaplasma* infection in free-ranging Iberian red deer in the region of Castilla-La Mancha, Spain. *Vet Mic*, 100, 163–173.
- De la Fuente J., Naranjo V., Ruiz-Fons F., Hofle U., Fernandez de Mera I.G., Villanua D., Almazan C., Torina A., Caracappa S., Kocan K.M., Gortazar C. (2005): Potential vertebrate hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum* in central Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 5, 390–401.

- de la Fuente J., Ruiz-Fons F., Naranjo V., Torina A., Rodríguez O., Gortázar C. (2007). Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. *Res Vet Sci.* 2008 Jun;84(3):382-6. Epub 2007 Jul 25.
- 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.
- Guía VET (2013-2014). Guía de productos zoonosanitarios para animales de producción. Editorial Grupo Asis, Zaragoza.
- Hornok S., Elek V., de la Fuente J., Naranjo V., Farkas R., Majoros G., Foldvari G. (2007): First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary. *Vet Mic*, 122, 316–322.
- Kieser, S.T., Eriks, I.E., Palmer, G.H. (1990) Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Infect. Immun.*58, 1117–1119.
- Kocan, K.M., Stiller, D., Goff, W.L., Claypool, P.L., Edwards, W., Ewing, S.A., McGuire, T.C., Hair, J.A., Barron, S.J. (1992). Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from infected to susceptible cattle. *Am. J. Vet. Res.* 5, 499–507.
- 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.
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., &Ewing, S. a. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol*, 167(2-4), 95–107.
- Kuttler K.L. (1984): *Anaplasma* infection in wild and domestic ruminants: a review *J Wildl Dis.* 1984 Jan;20(1):12-20.
- Martínez, S.; Corona, B.; Minet, C. y Albina, E. (2004). Comparación de las secuencias de los genes *msp5* y *mspα* de los aislados habana y Florida de *A. marginale*. *Rev. Salud Animal.* Vol. 26, No. 2: 73- 81.
- OIE. (2012). Bovine Anaplasmosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, VI (May), 589–600.
- Rar, V., Golovljova, I. (2011). *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus Neoehrlichia*” bacteria: Pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(8), 1842–1861.
- Reinbold, J. B., Coetzee, J. F., Hollis, L. C., Nickell, J. S., Riegel, C., Olson, K. C., Ganta, R. R., (2010). The efficacy of three chlortetracycline regimens in the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infection. *Vet Mic* 145 (2010) 69-75.
- Renneker, S., Abdo, J., Salih, D. E. a, Karagenç, T., Bilgiç, H., Torina, A., Seitzer, U. (2013). Can *Anaplasma ovis* in Small Ruminants be Neglected any Longer? *Transbound Emerg Dis.* 2013 Nov;60 Suppl 2:105-12.
- Rey, C.; Aso, P. M. y Coronado, A. (2003). Homologous and heterologous immunereaction between Venezuelan geographic isolates of *Anaplasma marginale*. *Ann. NY. Acad. Sci.* 916: 658-661.

- 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
- Rymaszewska, A., & Grenda, S. (2008). Bacteria of the genus *Anaplasma*—characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. *VeterinariMedicina*, 53(11), 573–584.
- 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. y Palmer, G. H. (1998). Anaplasmosis: A Review of Diagnostic Techniques. 8th National Veterinary hemoparasite Disease Conference.
- Visser, E. S.; McGuire, .C.; Palmer, G. H.; Davis, W. C.; Shkap, V.; Pipano, E. y Knowles, D. P. JR. (1992). The *Anaplasma marginale* msp5 genes encoded 19 kDa protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect. Immun.* 60: 5139-5144.
- Yasini, S. P., Khaki, Z., Rahbari, S., Kazemi, B., Amoli, J. S., Gharabaghi, A., & Jalali, S. M. (2012). Hematologic and clinical aspects of experimental ovine anaplasmosis caused by *Anaplasma ovis* in Iran. *Iran J Parasitol.* 2012;7(4):91-8.
- Zaugg, J. L. (1990). Seasonally of natural transmission of bovine anaplasmosis under desert mountain range conditions. *J Am Vet Med Assoc.* 1990 Apr 1;196(7):1106-9.