



Facultad de Veterinaria  
**Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Anaplasmosis ovina: transmisión vertical e inmunidad calostrual

Ovine anaplasmosis: vertical transmission and calostrual immunity

Autora

María Gómez Sebastián

Director

Delia Lacasta Lozano

Aurora Ortín Pérez

Facultad de Veterinaria

2016

---

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1. Caso clínico	3
2. El género <i>Anaplasma</i>	4
3. Anaplasmosis ovina	5
4. Transmisión vertical de la anaplasmosis ovina	8
5. Respuesta inmune frente al género <i>Anaplasma</i>	10
6. Calostro	12
<b>OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>14</b>
1. Desarrollo experimental	14
2. Hematologías y recuento diferencial de leucocitos	16
3. Detección de <i>Anaplasma ovis</i> mediante qPCR	16
4. Detección de anticuerpos frente <i>Anaplasma ovis</i> mediante cELISA	17
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>20</b>
<b>Evolución clínica y respuesta inmunológica de las ovejas frente a <i>Anaplasma ovis</i> desde el momento de la infección experimental hasta el periodo postparto:</b>	
1. Evolución clínica de la enfermedad	20
2. Análisis hematológicos y recuento diferencial de leucocitos	21
3. Resultados de la PCR Cuantitativa frente a <i>Anaplasma ovis</i>	23
4. Resultados de la detección de anticuerpos mediante cELISA	25
<b>Transmisión vertical de <i>Anaplasma ovis</i> y transferencia de anticuerpos a través del calostro:</b>	
1. Exploración clínica	27
2. Resultados de la PCR Cuantitativa frente a <i>Anaplasma ovis</i>	27
3. Resultados de la detección de anticuerpos mediante cELISA	28
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>30</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>31</b>
<b>VALORACIÓN PERSONAL</b>	<b>31</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>32</b>

## RESUMEN

El presente Trabajo Fin de Grado es la continuación de otros tres trabajos fin de grado realizados con anterioridad, los cuales surgieron de la necesidad de ampliar los conocimientos sobre la anaplasmosis ovina debido a la aparición de un mayor número de casos en España. Con él se pretende continuar con el estudio del desarrollo clínico de la enfermedad, indagando en la respuesta inmunológica del hospedador a la presencia de la bacteria *Anaplasma ovis* durante el ciclo productivo de los animales, así como determinar la posible transmisión vertical de la bacteria y la transferencia de inmunidad de la madre a los corderos a través del calostro. Para ello se han utilizado 3 ovejas que con anterioridad habían sido infectadas de forma experimental con *A. ovis* y que habían superado la enfermedad pero seguían siendo portadoras del germen.

Estas ovejas fueron sometidas a un ciclo productivo (gestación, parto y lactación), y los corderos nacidos fueron utilizados para el estudio. Para determinar el desarrollo clínico de la enfermedad y la respuesta inmunológica del hospedador, se han realizado en las ovejas evaluaciones clínicas periódicas y diversas pruebas laboratoriales: análisis hematológicos, recuento diferencial de leucocitos, PCR a tiempo real (qPCR) para valorar la evolución de la carga bacteriana y ELISA competitivo (cELISA) para la detección de anticuerpos frente a *A. ovis*. Por otro lado, para determinar la posible transmisión vertical de la infección se han realizado pruebas de qPCR a los corderos, previamente a la ingestión de calostro y tras la toma del mismo. Del mismo modo, para valorar si se produce la transferencia de inmunidad a través de la vía calostrada se ha llevado a cabo la detección de anticuerpos frente a *A. ovis* mediante cELISA en los calostros y en los sueros de los corderos antes y después de la toma de calostro, a los 3 días de vida y posteriormente de forma semanal durante un mes.

Los resultados revelan que bajo situaciones de estrés y de cambios fisiológicos, como el parto, *Anaplasma ovis* puede reactivarse y aparecer un nuevo brote clínico de la enfermedad. Además, en nuestro estudio, no se ha detectado transmisión transplacentaria de la bacteria, pero sí que se ha demostrado la transferencia de anticuerpos de la madre a los corderos a través del calostro.

## SUMMARY

This final project is the continuation of three previous final projects born from the need to expand knowledge of ovine anaplasmosis due to the emergence of new cases in Spain. It is intended to study the development and progression of the disease and the development of antibodies to the bacteria *Anaplasma ovis* during the production cycle of the animals.

Furthermore, the possible vertical transmission of the bacteria and transfer of immunity through the colostrum from the mother to the lambs were also studied. For this purpose three *A. ovis* experimentally infected sheep were used. These animals had overcome the disease but they were carriers of the germ. The sheep were subjected to a production cycle (pregnancy, lambbirth and lactation) and the obtained lambs were used for the study.

To determine the development of the disease, there were made periodic laboratory tests and clinical evaluations: hematology, differential leukocyte count, PCR for the evaluation of the bacterial load and ELISA for the detection of antibodies to *A. ovis*. On the other hand, to determine the possible vertical transmission of infection, qPCR has been executed to lambs before and after the ingestion of colostrum. Furthermore, to evaluate the transfer of immunity via colostrum, detection of antibodies by ELISA has been performed in colostrum and in lambs sera before and after colostrum intake, at three days after birth, and then weekly for a month.

The results show that under stress and physiological changes, such as lambing, the bacteria can reactivate and appear a new outbreak of disease. Furthermore, in our study, it could not be detected the passage of the bacteria through the placenta; nevertheless. It was demonstrated a transfer of antibodies from the mother to lambs via colostrum.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Caso clínico.

Este Trabajo Fin de Grado es la continuación de otros tres Trabajos Fin de Grado desarrollados con anterioridad. El origen de los mismos es un brote de anaplasmosis ovina acaecido en la comarca del Matarraña turolense. El caso fue remitido al Servicio Clínico de Rumiantes de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza (SCRUM) en el curso 2013-2014.

Los animales afectados presentaban un cuadro clínico inespecífico con debilidad extrema, anorexia y pérdida de peso, aunque también se observaban casos de conjuntivitis, abortos y cojeras. Afectaba a los animales de entre 1 y 3 años y, principalmente, a las ovejas de primer parto. Aunque en la zona se habían registrado casos esporádicos durante los años anteriores, la morbilidad del proceso aumentó considerablemente en el año 2014, llegando a alcanzarse en algunos rebaños, un 50-60% de prevalencia individual. En ese año el porcentaje de explotaciones afectadas (prevalencia colectiva) en la Comarca del Matarraña fue del 33%.

Los animales remitidos al SCRUM presentaban un cuadro similar al descrito a nivel de explotación, con debilidad extrema, anorexia, pérdida crónica de peso, conjuntivitis con epifora y picos de fiebre acompañados de atonía ruminal. Los análisis clínicos realizados

evidenciaron una anemia normocítica-normocrómica, elevación de los niveles séricos de las enzimas AST (aspartato-aminotransferasa) y GGT (gamma glutamil transferasa), así como hemoglobinuria, bilirrubinuria y proteinuria.

Finalmente, tras un largo procedimiento diagnóstico que orientó hacia un posible brote de anaplasmosis, se confirmó la presencia de *Anaplasma ovis* en los animales afectados mediante qPCR (PCR a tiempo real).

## **2. El Género *Anaplasma*.**

Los microorganismos del género *Anaplasma* son un grupo de bacterias Gram negativas que se localizan en la membrana de las vacuolas citoplasmáticas de las células sanguíneas de los mamíferos (Rar y Golovljova, 2011), son agentes intracelulares obligados que se multiplican en el interior de estas células (Rymaszewska y Grenda, 2008) y son transmitidos por garrapatas (Kocan et al., 2010; Brayton, 2012). Este género, junto con *Ehrlichia*, *Neorickettsia* y *Wolbachia*, conforman la familia *Anaplasmataceae*, perteneciente al orden de los *Rickettsiales* (Rar y Golovljova, 2011).

Existen seis especies de bacterias dentro del género *Anaplasma* sp., las cuales presentan diferencias en cuanto a los mamíferos que afectan, células sanguíneas en las que se multiplican y vectores biológicos más eficaces que las transmiten (Rymaszewska y Grenda, 2008). *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 éste la anaplasmosis granulocítica humana (Rar y Golovljova, 2011).

Tal y como se ha mencionado anteriormente, en función de la especie de anaplasma se ven afectadas un tipo de células sanguíneas u otras, de modo que, *A. platys* afecta a las plaquetas de los perros y *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, pero nunca en asociación con *A. ovis*, que es la verdadera causante de la anaplasmosis ovina, siendo ésta mucho más común (Alessandra y Santo, 2012). *A. centrale* se considera una especie de menor patogenicidad, ya que cursa de forma leve en los animales y confiere cierta inmunidad protectora de larga duración frente a cepas de *A. marginale*. *A. bovis*, que tiene tropismo por monocitos, también se ha descrito como causante de la anaplasmosis bovina. Finalmente, *A. phagocytophilum* es un agente zoonótico que presenta tropismo por células de la serie blanca y ha sido descrita como causante de la

enfermedad en humanos, rumiantes, caballos, roedores, perros (*Rar y Golovljova., 2011*) y, menos frecuentemente, en gatos (*Little, 2010*).

En el ciclo biológico de este patógeno interviene un hospedador mamífero, en el que la bacteria se multiplica en las células diana, y un vector que facilita su vehiculización. Los vectores más importantes de esta enfermedad son las garrapatas de los géneros *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Hyaloma* y *Amblyomma*, las cuales actúan como vectores biológicos, ya que la bacteria se multiplica en sus células intestinales y posteriormente se disemina al resto del organismo, siendo imprescindible para la transmisión a los hospedadores su localización en las células epiteliales de las glándulas salivares de la garrapata (*Kocan et al. 2010*). También pueden actuar como vectores mecánicos otros artrópodos hematófagos o agujas y material quirúrgico en una posible transmisión iatrogénica (*Rymaszewska y Grenda, 2008*).

### **3. Anaplasmosis ovina.**

La anaplasmosis ovina, generalmente, está causada por *A. ovis*, aunque ocasionalmente pueden intervenir *A. marginale* y *A. phagocytophilum* (*Alessandra y Santo, 2012*). *A. ovis* fue descrito por primera vez por Bevan en 1912 (*Bevan, 1912*), pero no ha sido tan estudiada como otras especies de *Anaplasma sp.*, por lo que todavía se desconoce bastante acerca de su epidemiología, patogenia y tratamiento (*Renneker et al. 2013*). Afecta tanto a cabras como a ovejas, aunque en las primeras se describe como una enfermedad subclínica no patógena, si bien en ciertas ocasiones puede provocar cuadros más graves (*Alessandra y Santo, 2012*). *A. ovis* ha sido aislado en Portugal, Italia, Francia, Centro Europa (*Derdáková et al., 2011; Víchová et al., 2014*), y España (*Hurtado et al., 2015*), y también en Turquía, Iraq, India, y USA (*Renneker et al. 2013*), pero en estos últimos países su presencia no siempre se ha relacionado con manifestación clínica de la enfermedad.

*A. ovis* penetra en el eritrocito por invaginación, sin producir daño, se encierra en una vacuola y se multiplica por fisión binaria en forma de cuerpo de inclusión. Posteriormente, las bacterias abandonan los eritrocitos mediante mecanismos no líticos y pasan a infectar nuevos eritrocitos (*Corona, 2004*). La grave anemia hemolítica que, en ocasiones, se produce tras la infección es consecuencia de la respuesta inmune del hospedador, que es tanto de tipo celular como humoral, ya que no existe evidencia de hemólisis intravascular causada directamente por la bacteria. La anemia es debida a la fagocitosis que se produce por parte de los macrófagos del bazo sobre los eritrocitos infectados y por una destrucción inmunomediada de eritrocitos, tanto infectados como no infectados (*Bautista, 1996*)

En las zonas donde la enfermedad es endémica, los signos clínicos muchas veces son inaparentes. Las formas clínicas agudas de enfermedad se han asociado a factores de estrés tales como: temperaturas elevadas, vacunaciones y desparasitaciones, elevada carga parasitaria por garrapatas, pobres condiciones sanitarias, movimientos de animales y transporte de largas distancias, etc. (Renneker et al., 2013). También se han asociado a coinfecciones con otros hemoparásitos como *Babesia ovis*, *B. motasi*, *Theileria sp.* y *Mycoplasma ovis* (Hornok et al., 2008) o a la aparición de otras enfermedades concomitantes (Alessandra y Santo, 2012). Además, parece que la gravedad de los síntomas depende también de otros factores tales como la edad, la raza, la inmunización previa con la bacteria, la dosis infectiva y la condición corporal del animal antes de la infección (Corona, 2004; Torina et al., 2010). En casos puntuales, se puede llegar a producir la muerte del animal (Ciani et al., 2013).

Al comienzo de la infección aparece anemia normocítica y normocrómica, y conforme evoluciona la enfermedad, aumenta el recuento de reticulocitos (anemia regenerativa) y la anemia pasa a ser macrocítica y normocrómica (Yasini et al, 2012). Sin embargo, durante la fase aguda, al contrario que en otras enfermedades transmitidas por garrapatas, no suele aparecer hemoglobinemia, hemoglobinuria ni ictericia (Bautista 1996; Kocan. et al., 2010).

La infección de las células sanguíneas se hace visible al microscopio a las 2-6 semanas desde la transmisión, ya que durante la fase aguda, el número de eritrocitos infectados se duplica cada 24-48h (Bautista, 1996; OIE art., 2012). Sin embargo, la destrucción de los eritrocitos y la anemia no son inmediatas, los cambios notorios comienzan a observarse en torno a los 20 días post-infección. Esta fase se caracteriza por fiebre, pérdida de condición corporal, abortos, baja producción de leche, palidez de las mucosas y severa anemia, que puede llevar a la muerte del animal. Además, la anemia, puede ser causante de una insuficiencia hepática, como consecuencia de una hipoxia hepatocelular. Esto explicaría los niveles séricos elevados de las enzimas AST (indicador de daño en la célula hepática) y GGT (indicador de trastornos que afectan al drenaje de la bilis), obtenidos en las pruebas bioquímicas. Todas estas alteraciones afectan directamente a la producción del animal, que se ve seriamente comprometida (Rymaszewska y Grenda, 2008). No obstante, algunos de los animales infectados se recuperan de forma espontánea.

Tras la fase aguda, lo habitual es que el animal se recupere clínicamente sin llegar a eliminar por completo la bacteria, que queda latente en el hospedador. El patógeno consigue evadir la respuesta inmune del organismo debido a las variaciones antigénicas que se producen en las proteínas inmunodominantes localizadas en su membrana externa (Suarez y Noh, 2011) y el

animal infectado que supera la enfermedad se convierte en portador de un bajo número de bacterias que no es detectable microscópicamente (*Bautista, 1996*). El posible rebrote de la enfermedad se ve favorecido por cambios fisiológicos o factores estresantes (*Alessandra y Santo, 2012*). Los animales portadores subclínicos son fundamentales para perpetuar el ciclo biológico del patógeno en un ecosistema, dado que son los principales reservorios a partir de los cuales las garrapatas captarán la bacteria al alimentarse y la diseminarán entre los animales no infectados.

El diagnóstico clínico de esta enfermedad es complicado debido a la ausencia de lesiones características y a la falta de especificidad del cuadro clínico (*Hornok et al. 2007; Alessandra y Santo 2012*). Los parámetros hematológicos que más información clínica arrojan sobre la gravedad y el pronóstico de la enfermedad son: el recuento de glóbulos rojos y el valor hematocrito (*Ciani et al., 2013*). Pese a la dificultad diagnóstica, en zonas donde hay antecedentes de anaplasmosis ya diagnosticados, aproximar un diagnóstico clínico es posible, siendo siempre necesaria una confirmación laboratorial (*Kocan et al., 2010*).

Previamente al desarrollo de las técnicas moleculares, el diagnóstico laboratorial se realizaba mediante microscopía óptica, observando inclusiones eritrocitarias en extensiones de sangre periférica teñidas con colorante Giemsa (*Oie, 2012*). Esta prueba ha quedado obsoleta debido a su baja sensibilidad y especificidad, además se necesita una gran experiencia para poder dar un diagnóstico fiable, y en ningún caso se puede identificar la especie de *Anaplasma*. Esta prueba detecta la bacteria cuando el porcentaje de eritrocitos infectados es mayor de 0,1-0,2 % (*Corona, 2004*), lo cual tan solo se produce durante un corto periodo de tiempo, entre las semanas 2-6 post-infección. Por ello, esta prueba es útil para diagnosticar un brote agudo, pero inservible para diagnosticar animales con infección crónica o subclínica (*Oie art., 2012*).

Las técnicas de diagnóstico molecular, como la qPCR, han mejorado considerablemente las posibilidades de diagnóstico directo, gracias a su gran sensibilidad y especificidad, ya que son capaces de detectar infecciones con un mínimo de 0,0001% de eritrocitos infectados. Además de permitir detectar bajas concentraciones de bacteria, tienen la capacidad de identificar la especie de anaplasma presente (*OIE art., 2012; Bautista, 1996*). Estas técnicas también permiten detectar la presencia de patógenos en los vectores con cierta facilidad (*Shkap et al., 2009*).

Otras pruebas laboratoriales que se usan de manera rutinaria para el diagnóstico de anaplasmosis, especialmente en el ganado bovino, son las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos frente a anaplasma. Estas pruebas son indirectas, puesto que miden

la reacción del hospedador frente al patógeno. Dentro de este grupo, la más utilizada y la más fiable es el ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Kocan et al., 2010). Debido a la gran estabilidad que tiene la proteína MSP5 (una de las varias proteínas principales de superficie que posee la bacteria), que está presente en todas las especies de anaplasma, es posible emplear kits comerciales para una especie en otras. Sin embargo, con estas técnicas no existe la posibilidad de distinguir si la enfermedad la están causando *A. marginale* o *A. ovis* (Hornok et al., 2007), por lo que deberían complementarse con las técnicas moleculares de diagnóstico directo.

La anaplasmosis ovina se transmite principalmente a través de las especies de garrapatas *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus turanicus*, *Dermacentor silvarum*, *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor andersoni* y *Haemaphysalis sulcata* (Alessandra and Santo, 2012). También puede transmitirse por insectos hematófagos, como el tábano, *Tabanus sp.* o la mosca de los establos, *Stomoxys calcitrans* (Hornok et al., 2008), e incluso a través de vectores mecánicos que entren en contacto con la sangre, como agujas o material quirúrgico.

#### **4. Transmisión vertical de la Anaplasmosis ovina.**

Son muy pocos los estudios realizados sobre la transmisión vertical de la anaplasmosis, de modo que el desconocimiento sobre este tema es todavía muy amplio, especialmente en la especie ovina, donde ningún trabajo, según nuestro conocimiento, ha sido llevado a cabo sobre este tema. En el caso de la anaplasmosis bovina, que ha sido más estudiada, los resultados sobre la posible transmisión transplacentaria de *A. marginale* son confusos e incluso difieren unos de otros. Así, Kutter, en 1984, concluye que no existe dicha transmisión, sin embargo, otros estudios realizados sugieren que esta vía de transmisión es posible en vacas gestantes durante la fase aguda de la enfermedad o bajo condiciones de continua exposición a la bacteria en áreas endémicas (Fowler y Swift, 1975; Swift y Paumer, 1976, 1978; Zaugg y Kuttler, 1984; Zaugg, 1985; Potgieter y Vanrensburg, 1987; Ribeiro et al., 1995; Maldonado et al., 2012; Grau et al., 2013; Silva y Fonseca 2014; Silva et al., 2015; Lopo et al, 2016).

Parece ser que la importancia de esta vía de transmisión podría variar en función de la región, de las condiciones climáticas, del animal, de la presencia de vectores y de la variabilidad genética del agente (Lopo et al., 2016). Además, varios estudios concluyen que la transmisión se produce entre el segundo y el último tercio de la gestación (Fowler y Swift, 1975; Swift y Paumer, 1976, 1978; Zaugg y Kuttler, 1984; Zaugg, 1985; Potgieter y Van Rensburg, 1987; Ribeiro et al., 1995). Zaugg (1985) describe la infección intrauterina temporal de *A. marginale*,

lo que genera una respuesta inmune en el recién nacido, y además éste se convierte en un posible reservorio de la infección.

En un ensayo posterior llevado a cabo en el sur de Brasil se confirmó que las vacas seropositivas a *A. marginale* pueden transferir anticuerpos a su descendencia, a través del calostro, en niveles detectables mediante técnicas serológicas (IFAT y ELISA) (Grau et al, 2013). Pero también se evidenció que el 10% de los terneros descendientes de vacas con infección crónica presentaban anticuerpos frente a *A. marginale* al nacimiento, previamente a la toma de calostro. Además, el 66,7% de estos terneros seropositivos al nacimiento (lo que representa el 6,67% del total de terneros nacidos) fueron qPCR positivos, es decir, en ellos pudo demostrarse la presencia de ADN de la bacteria mediante qPCR. De estos hallazgos se deduce que vacas infectadas crónicamente con *A. marginale* y sin historia de anaplasmosis aguda durante la gestación, podrían transmitir la bacteria a su descendencia por vía transplacentaria (Grau et al, 2013).

En otro estudio realizado sobre un caso clínico de anaplasmosis bovina aguda, en el norte de Brasil, también se detectó la existencia de la transmisión vertical de esta bacteria, ya que previamente a la toma de calostro, el 16,6% de los terneros descendientes de vacas infectadas fueron qPCR positivos y el 26,4% presentaron anticuerpos frente a *A. marginale* (Lopo et al., 2016).

Estos estudios indican que tanto en las infecciones agudas como en las crónicas se puede producir la transmisión transplacentaria del anaplasma, que se llevaría a cabo durante la fase extraeritrocitaria de la bacteria, cuando se libera de un eritrocito para infectar a otros (Zaugg y Kuttler, 1984; Lopo et al., 2016). Esta infección puede ser eliminada por el feto en el útero, excepto en situaciones donde la carga bacteriana sea elevada, en cuyo caso, el feto es incapaz de erradicar la infección, lo que permite el establecimiento de la fase intra-eritrocitaria y la infección permanente (Zaugg, 1985).

En este contexto, es posible que los factores inmunosupresores o la constante reinfección de las vacas sean importantes para este tipo de transmisión (Silva y Fonseca 2014). La inmunosupresión transitoria que se produce en las hembras en el periparto podría ser la razón de un incremento de las infecciones subclínicas y, posiblemente, la causa de la transmisión vertical de la bacteria (Lopo et al., 2016).

En los estudios realizados por Pypers et al. (2011) y Lopo et al., (2016) se observó que algunos de los terneros con anaplasmosis que murieron, presentaban también una coinfección con BVD. Por lo tanto resulta complicado determinar cuál de las dos enfermedades provocó la muerte de éstos animales. Sin embargo, en el estudio realizado por Lopo et al. (2016), uno de los terneros fue negativo a BVD, lo que hace posible que la anaplasmosis fuese la única responsable de la muerte de este animal. Por tanto, este hecho refuerza la hipótesis de que la anaplasmosis puede ser la causa de algunas muertes neonatales no diagnosticadas (Norton et al., 1983) y debe formar parte del diagnóstico diferencial.

El escenario anterior demuestra la complejidad de la transmisión transplacentaria de la anaplasmosis e indica la necesidad de realizar nuevos estudios sobre este tema. Por ejemplo, se desconoce si las hembras con infección crónica pueden transmitir la bacteria en gestaciones sucesivas. Tampoco se conoce si la diferencia en la virulencia entre cepas o si la variabilidad genética puede influir en la capacidad de transmisión de la infección y la enfermedad al feto.

Por otro lado, como ya se ha comentado, no existe ningún estudio sobre la transmisión vertical de *Anaplasma ovis*, y por ello el presente trabajo, aunque de una forma modesta por el escaso número de animales que incluye, pretende arrojar algo de luz sobre esta posible vía de transmisión.

## **5. Respuesta inmune frente al género *Anaplasma***

Apenas existe información sobre el desarrollo de la inmunidad frente al género *Anaplasma* en ovinos. La bacteria *A. ovis* prácticamente afecta solo a la especie ovina, una especie que, en la actualidad, tiene un escaso valor económico lo que hace que se invierta poco en investigación. Además, es una enfermedad que principalmente se distribuye en países tropicales y subtropicales, en los cuales existe menor desarrollo económico. Por estos motivos apenas se ha investigado sobre esta enfermedad en esta especie. Sin embargo, sí que se han realizado estudios sobre otras bacterias del género *Anaplasma* (*A. marginale* y *A. phagocytophilum*), las cuales también pueden afectar a la especie ovina, aunque de forma ocasional.

La respuesta inmune frente a la infección por *A. marginale* requiere la activación tanto de células T CD4+ como de la producción de anticuerpos. Las células T CD4+ ayudan a las células B para la producción de IgG y, a través de la secreción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), juegan un papel importante en la activación de los macrófagos para producir moléculas bactericidas

(Brown, 2012). La intensidad de la respuesta celular se correlaciona con el desarrollo de inmunidad frente a la enfermedad (Corona et al., 2004). La respuesta humoral también tiene relevancia en la defensa frente a esta enfermedad. Así la monitorización de la respuesta inmune en el ganado bovino frente a la infección con *A. marginale* ha evidenciado una fuerte respuesta humoral con niveles de IgG1 y IgG2 que fluctúan en el curso agudo de la enfermedad y durante la infección persistente (Brown, 2012)

Esta respuesta humoral se dirige fundamentalmente frente a la inmunodominante y antigénicamente variable proteína de membrana externa MSP2, aunque también se han detectado anticuerpos frente a otras proteínas de membrana (MSP1, MSP3, MSP4 y MSP5) (Brown, 2012). Se cree que estos anticuerpos actúan mediante la neutralización extracelular de las bacterias en el proceso de invasión de nuevos eritrocitos o por opsonización de las bacterias que luego serán fagocitadas por los macrófagos. No se han detectado anticuerpos en la superficie de eritrocitos infectados, por lo que se deduce que la fagocitosis de estos eritrocitos ocurre a través de otros mecanismos (Brown, 2012). Esta respuesta inmune humoral controla la bacteriemia aguda inicial, así como los picos de bacteriemia que surgen durante la infección persistente frente a nuevas variantes antigénicas, pero no es suficiente para eliminar la infección y los animales se mantienen infectados de por vida (Brown, 2012).

Respecto al desarrollo de la respuesta inmune durante la infección de *A. phagocytophilum* en ovejas, se ha documentado la existencia de una fuerte inmunosupresión debida a la leucopenia que produce la bacteria, que afecta tanto a granulocitos como a linfocitos y favorece la aparición de procesos secundarios. En ovejas infectadas experimentalmente con dicho patógeno tiene lugar, seis días después de la infección, una reducción significativa en el número total de linfocitos circulantes asociada a la pérdida tanto de linfocitos B como T (CD4+, CD8+ y CD4-, CD8-). Los anticuerpos frente a esta infección pueden detectarse a las dos semanas de la inoculación, pero disminuyen conforme pasa el tiempo y desaparecen al cabo de 12 semanas (Brown, 2012).

Puede decirse por tanto que la respuesta inmune que se desencadena frente a esta enfermedad es compleja. Además, las bacterias del género *Anaplasma* han desarrollado mecanismos para evadir tanto la respuesta inmune innata, como la adaptativa. Estos incluyen la manipulación del neutrófilo hospedador, en el caso de *A. phagocytophilum*, para prevenir la apoptosis celular y los mecanismos de destrucción de neutrófilos, y la variación antigénica de las proteínas de membrana (Brown, 2012). Esto implica que tanto *A. marginale* como *A.*

*phagocytophilum* plantean problemas en el desarrollo de vacunas. A pesar de presentar diferente tropismo intracelular, ambas bacterias desarrollan una infección persistente que es crítica para la transmisión de la infección a animales susceptibles a través de las garrapatas. Sin embargo, se ha observado que los animales inmunizados a través de una vacuna elaborada con proteínas de la membrana externa son más capaces de controlar la bacteriemia que los animales no vacunados (*Palacios, 2014*). La diferencia entre la evasión de la respuesta inmune resultante en animales persistentemente infectados y la eliminación completa tras la vacunación, es la inducción de anticuerpos contra las proteínas conservadas que se produce tras la vacunación, pero que no se da durante la infección natural (*Palacios, 2014*).

## **6. Calostro**

La especie ovina presenta una placenta sindesmocorial, por tanto no hay transferencia de anticuerpos por esta vía, de manera que la transferencia pasiva de la inmunidad materna a través del calostro es de vital importancia para el recién nacido. Aunque los neonatos nacen con el sistema inmune competente, en el ambiente protector del útero no se produce estimulación antigénica y al nacimiento los corderos son hipogammaglobulinémicos (*Fernández et al., 1994*).

El calostro es la primera secreción mamaria post parto, constituye el único y principal alimento para el neonato, tiene función laxante para favorecer la expulsión del meconio y, además, contiene gran cantidad de gammaglobulinas, y células con actividad inmunológica (*Fernández et al., 1994*).

El calostro se forma durante la gestación por el paso selectivo de inmunoglobulinas de la circulación general a la glándula mamaria. Estas inmunoglobulinas, por orden decreciente, son IgG, IgM e IgA. El origen de la IgG e IgM es exclusivamente sérico, mientras que la IgA se sintetiza a nivel local. La transferencia transmamaria de Igs se ve favorecida por los estrógenos y la progesterona presentes en los últimos meses de gestación (*Fernández et al., 1994*).

La concentración de Ig en el calostro desciende rápidamente tras el parto, llegando a disminuir un 50% entre las 9-12 horas post-parto y un 85 % en las 48 horas siguientes. Además, el calostro contiene componentes inmunológicos tales como células T y B, neutrófilos, macrófagos, células epiteliales y fagocíticas, factores del complemento, productos resultantes de la memoria inmune de la madre y otros componentes fundamentales para el desarrollo del cordero (*Fernández et al., 1994*).

Al final de la gestación, numerosas células linfoides procedentes del sistema inmunitario de las mucosas de la hembra se acumulan en la glándula mamaria y pasan al calostro. Estas células incluyen linfocitos T y B, que son absorbidos en el tracto intestinal de los recién nacidos, atraviesan la barrera intestinal y pasan a la circulación linfática, alcanzando posteriormente los linfonodos mesentéricos. Estas células permanecen activas y pueden transferir memoria inmunológica al neonato, por tanto, son importantes en el desarrollo del estatus inmunológico del mismo (*Tuboly y Bernáth, 2002*).

La ingesta del calostro debe tener lugar en las primeras horas de vida, ya que la absorción intestinal de inmunoglobulinas y de ciertas células con actividad inmunológica presentes en el calostro es muy eficiente durante las primeras 24 horas de vida del recién nacido. A partir de las 12 horas de vida se reduce de forma gradual la permeabilidad del intestino hasta desaparecer por completo (*Ramos et al., 2006*).

## **OBJETIVOS.**

Tras el diagnóstico del caso clínico de anaplasmosis ovina acaecido en la comarca del Matarraña y las importantes pérdidas económicas que supuso, hemos encontrado una gran dificultad para encontrar información actualizada en la bibliografía sobre esta enfermedad. De modo que, con el desarrollo de este Trabajo Fin de Grado, que complementa a otros tres Trabajos Fin de Grado sobre la anaplasmosis ovina desarrollados con anterioridad, se pretende avanzar en el conocimiento de una enfermedad que en los últimos años está adquiriendo mayor relevancia en nuestro país debido a la aparición de un mayor número de casos.

El objetivo principal de este trabajo es aportar más información acerca de esta enfermedad durante la fase del ciclo productivo de la oveja que incluye la gestación, el parto y la lactación. Se pretende conocer la evolución de la enfermedad desde la infección experimental hasta el post-parto y determinar la posible transmisión materno-filial de *A. ovis* y la transferencia de anticuerpos frente a la bacteria a través del calostro. Para conseguirlo se han utilizado tres ovejas infectadas experimentalmente con *A. ovis* durante el desarrollo de uno de los Trabajos Fin de Grado previos y se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Valorar la repercusión del estrés de la gestación y del parto en el desarrollo de los signos clínicos de la enfermedad y en la carga bacteriana en las ovejas infectadas experimentalmente.
2. Determinar la posible transmisión de la infección vía transplacentaria.

3. Determinar si la infección puede transmitirse vía calostro.
4. Determinar la evolución de los anticuerpos séricos frente a *Anaplasma ovis* y la carga bacteriana en las ovejas desde el momento de la infección experimental hasta el día 304 post infección, periodo que incluye gestación, parto y post parto.
5. Estudiar la presencia de anticuerpos frente a *Anaplasma ovis* en el calostro.
6. Evaluar la transmisión de inmunidad humoral, a través del calostro, a los corderos nacidos de las ovejas infectadas experimentalmente.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

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

### **1. Desarrollo experimental**

Es necesario resaltar que este trabajo es continuación del realizado en el año 2015, por José Calasanz Jiménez Gracia, titulado “Infección experimental por *Anaplasma ovis*”, en el cual se inoculó experimentalmente sangre infectada con *Anaplasma ovis* procedente de dos animales afectados de la enfermedad a tres corderas libres del patógeno y se estudió la evolución de los signos clínicos en relación a la bacteriemia detectada mediante técnicas moleculares de qPCR.

Tal como se describió en dicho trabajo fin de grado, las tres ovejas eran de la raza Rasa Aragonesa identificadas con los crotales: 126, 127 y 128. Dichos animales nacieron en el Servicio Clínico de Rumiantes de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza y fueron infectadas experimentalmente con *A. ovis*, en mayo de 2015, a los 11 meses de edad.

Durante el desarrollo de la infección experimental las ovejas presentaron una clínica leve, mostrando diversos picos de anemia de tipo normocítico-normocrómico relacionados con los picos de bacteriemia. En cuatro meses, y sin haberles sido administrado ningún tratamiento, los animales superaron la infección de manera natural, desapareciendo por completo la anemia. Sin embargo, las tres ovejas permanecieron con unos niveles bajos de bacteriemia detectables mediante qPCR, quedando como portadoras asintomáticas de la infección.

Para la realización del presente trabajo las tres ovejas infectadas experimentalmente fueron sometidas a un ciclo productivo (gestación, parto y lactación). La cubrición se realizó mediante monta natural en el otoño de 2015 y la gestación fue confirmada a través de ecografía abdominal.

Durante el periodo experimental las ovejas fueron sometidas a una exploración física general de forma periódica valorando condición corporal, temperatura, coloración de las mucosas, auscultación respiratoria y cardíaca, auscultación de los movimientos ruminales y valoración del tamaño de los linfonodos y, tras el parto, la exploración se realizó diariamente durante una semana. Además, utilizando tubos tipo “vacutainer”, se tomaron en la vena yugular muestras de sangre con EDTA y sin anticoagulante, antes de la cubrición, de forma mensual durante la gestación, el día del parto, a los tres días postparto y posteriormente de forma semanal hasta que los animales recuperaron los valores hematológicos normales, aproximadamente tres meses después. Las muestras de sangre entera con EDTA se destinaron a la realización de hematologías y la detección al microscopio de formas compatibles con el género *Anaplasma*. Además, se guardaron en congelación a -20°C alícuotas de todas las muestras de sangre entera tomadas, para su análisis por qPCR para la detección específica de la bacteria *Anaplasma ovis*. Las muestras de sangre sin anticoagulante fueron procesadas para la obtención del suero sanguíneo y fueron almacenadas en congelación a -20°C hasta su análisis mediante técnicas de ELISA para la detección de anticuerpos frente a *A. ovis*.

Inmediatamente tras el parto, se tomaron muestras de calostro de las tres ovejas para determinar la presencia de anticuerpos frente a *A. ovis* mediante ELISA. Hasta la realización de los análisis, las muestras de calostro procedentes de las ovejas 126, 127 y 128 fueron alícuotadas y conservadas en congelación a -20°C. Varias alícuotas de calostro de la oveja 126 fueron procesadas en fresco mediante distintos procedimientos antes de la realización de los análisis.

Los corderos fueron supervisados tras el nacimiento, procediéndose a la desinfección del cordón umbilical, y fueron alimentados de forma natural por sus madres. En la siguiente tabla, se muestran datos relativos al parto relevantes para el desarrollo del estudio y la identificación de todos los animales estudiados:

Oveja	Fecha de parto	Nº de descendientes	Identificación descendientes
128	20/02/2016	2	087 y 088
127	26/02/2016	2	092 y 093
126	20/03/2016	2	Mortinato y 094

**Tabla 1:** datos relativos al parto e identificación de los animales.

De todos los corderos nacidos vivos se tomaron de la vena yugular muestras de sangre (con EDTA y sin anticoagulante) antes de la toma de calostro e inmediatamente tras la ingesta de

éste, así como los días 3, 10, 17, 24 y 31 tras el nacimiento. Para asegurar que la primera muestra recogida fuese de sangre precalostril, durante los días previos al parto se colocó un coloide en los pezones de las hembras para sellarlos e impedir que los corderos mamasen tras el nacimiento. Posteriormente, tras la recogida de la muestra de sangre precalostril el coloide fue retirado para que los corderos tetaran de manera natural vigilando que se encalostrasen adecuadamente. Las muestras de sangre entera fueron alicuotadas y guardadas en congelación a -20° C hasta ser analizadas mediante qPCR para la detección específica de la bacteria *Anaplasma ovis*. Las muestras de sangre sin anticoagulante fueron procesadas para la obtención del suero sanguíneo y almacenadas en congelación a -20°C hasta su análisis mediante técnicas de ELISA para la detección de anticuerpos frente a *A. ovis*.

## **2. Hematologías y recuento diferencial de leucocitos.**

Las muestras de sangre entera con EDTA tomadas de las ovejas fueron sometidas a un análisis hematológico en el laboratorio de Análisis Clínicos de la Unidad de Patología General y Médica, utilizando un contador hematológico automático Vet-ABC de la empresa DIVASA FARMAVIC, SA. Asimismo, se realizaron extensiones que posteriormente fueron teñidas con Giemsa al 10% para la visualización al microscopio de formas compatibles con el género *Anaplasma* y la realización del recuento diferencial de leucocitos. Para ello, las extensiones de sangre, una vez secas, fueron fijadas con metanol, durante 10 minutos, y después sumergidas en 5 ml del colorante diluido en agua destilada en proporción 1/10 durante 20-25 minutos. Posteriormente, fueron aclaradas con agua del grifo y se dejaron secar antes de ser observadas al microscopio

## **3. Detección de *Anaplasma ovis* mediante qPCR.**

La detección específica de *Anaplasma ovis* en las muestras de sangre entera de ovejas y corderos conservadas en congelación fue realizada por los laboratorios EXOPOL mediante qPCR (Quantitative-real time PCR Real Time Polymerase Chain Reaction). Es una técnica de diagnóstico molecular que cuantifica a tiempo real el producto resultante de la amplificación de un fragmento específico de ADN. Permite calcular el número de copias de ADN iniciales presentes en la muestra problema comparando la curva de amplificación de ésta con la curva de amplificación estándar de una muestra de concentración conocida. Esta prueba utiliza como diana el *gen msp4* (major surface protein 4), específico de *Anaplasma ovis* y tiene una sensibilidad de 50 copias/rxn (límite inferior de cuantificación).

El ADN de las muestras se extrajo utilizando el equipo de extracción automática de ácidos nucleicos "LABTURBO 48C" de la casa TAIGEN Co. y el kit comercial Labturbo DNA Mini kit 480. El ensayo incluye un control endógeno que permite identificar un gen del genoma del hospedador válido para cualquier muestra de rumiante. Como control positivo utiliza un oligonucleótido sintético del gen diana de *Anaplasma ovis*, el cual incluye los sitios de unión de las sondas de amplificación del ensayo y está cuantificado en  $5 \times 10^6$  copias/reacción.

#### **4. Detección de anticuerpos frente a *Anaplasma ovis* mediante cELISA.**

La detección de anticuerpos frente a *Anaplasma ovis* en los sueros de las ovejas y corderos y en los calostros se realizó mediante un test cELISA (Competitive, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), utilizando el ANAPLASMA ANTIBODY TEST KIT, cELISA v2 (VmrD, USA). Este test está diseñado para detectar anticuerpos específicos frente a *Anaplasma marginale* en muestras de suero bovino, pero puede ser empleado eficazmente para el diagnóstico de la infección por *A. ovis* en muestras ovinas utilizando los propios controles del kit (Scoles et al., 2008). Los pocillos de la placa se encuentran recubiertos por el antígeno MSP5 (Scoles et al., 2008), el cual es compartido por *A. marginale* y *A. ovis* (Hornok et al., 2007). De manera que, si el suero problema presenta anticuerpos frente a este antígeno, ambos se unen formando un complejo antígeno-anticuerpo e inhiben la unión entre el antígeno y el anticuerpo monoclonal marcado con la enzima peroxidasa del rábano. La unión o la falta de unión antígeno-anticuerpo monoclonal marcado se detecta mediante la adición del sustrato de la enzima y se cuantifica de acuerdo al desarrollo de un producto coloreado, que corresponde a la unión del anticuerpo marcado suministrado con el kit y el antígeno de anaplasma que tapiza la placa. Con el control negativo se obtiene una coloración intensa debido a que no hay ningún anticuerpo anti-anaplasma que pueda bloquear esta unión. En las muestras de suero, si hay anticuerpos anti-anaplasma se produce competencia con el anticuerpo marcado del Kit y una parte de antígeno de la placa se unirá al anticuerpo de la muestra y no al anticuerpo marcado, por lo que el color que se aprecie será de menor intensidad. Así, en los pocillos de las muestras, un color débil o la ausencia de color indica la presencia de anticuerpos frente a anaplasma, mientras que un color fuerte indica la ausencia de anticuerpos anti-anaplasma.

El test se ha realizado de acuerdo al siguiente protocolo:

- Depositar por duplicado 50µl de la muestra problema y los controles positivo y negativo en los pocillos de la placa de ELISA del kit tapizada con el antígeno.
- Incubar durante una hora a temperatura ambiente ( $23 \pm 2$  °C).

- Lavar la placa dos veces con la solución de lavado (1 parte de solución de lavado concentrada suministrada en el kit y 9 partes de agua destilada).
- Añadir 50µl del conjugado diluido (60µl del conjugado concentrado anticuerpo-peroxidasa y 5.940 ml de la dilución tampón del conjugado suministrada en el kit) en cada pocillo e incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- Lavar cuatro veces con la solución de lavado.
- Añadir 50µl de sustrato e incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20 minutos.
- Añadir a cada pocillo 50µl de la solución de parada inmediatamente después medir en un espectrofotómetro de absorbancia los valores de densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 620, 630 ó 650nm.

Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición (% I) que se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% I = 100 [1 - (\text{DO de la muestra} / \text{DO del control negativo})]$$

El porcentaje de inhibición es el porcentaje en el que se consigue inhibir la señal que se observa con el control negativo. Indica la proporción en la que los anticuerpos anti-anaplasma que posee la muestra han conseguido bloquear la unión entre el anticuerpo marcado del kit y el antígeno de la placa. No obstante, es un método cualitativo, que no permite la cuantificación de los anticuerpos de la muestra.

En bovino, las muestras que posean un porcentaje de inhibición inferior a 30, son consideradas negativas y aquellas cuyo porcentaje de inhibición sea superior a 30, se consideran positivas. Sin embargo, en un estudio llevado a cabo por Scoles et al. (2008), todas las ovejas qPCR negativas mostraron un porcentaje de inhibición inferior a 22. En este mismo ensayo se observó que existía una concordancia del 84% entre los resultados de qPCR, IFA (Immunofluorescence Assays) y ELISA utilizando el 30% de inhibición como punto de corte. No obstante 10 de los 14 resultados dispares fueron ELISA negativos y qPCR e IFA positivos, lo cual indica que el uso de este punto de corte no es apropiado para el diagnóstico serológico en ovino. Pese a ello se demostró que este kit comercial era adecuado para el diagnóstico indirecto de *A. ovis* utilizando como punto de corte el 19% de inhibición (fundamentado en una concordancia >90% con IFA y qPCR) con una especificidad del 96,3% y una sensibilidad del 98,2%. Por tanto, en nuestro caso, aquellos sueros que mostraron un porcentaje de inhibición del 19% o superior fueron considerados positivos.

Dada la compleja composición del calostro, para poder realizar esta prueba en este tipo de muestra fue necesario llevar a cabo una etapa previa de purificación con el objetivo de obtener el suero del calostro, en el que se encuentran las inmunoglobulinas que se pretenden detectar, eliminando otros componentes calostrales que podrían dificultar la detección de las Ig. Para ello se probaron diversos protocolos:

- Obtención del suero de calostro mediante coagulación ácida de calostro fresco: añadir al calostro HCl 0,1N hasta alcanzar un pH de 4,4, centrifugar a 3000g durante 15 minutos a 4°C, recuperar el sobrenadante y guardar una alícuota. Centrifugar la cantidad restante a 12000g durante 15 minutos a 4°C. Recuperar el sobrenadante. Neutralizar los sobrenadantes con NaOH hasta alcanzar un pH de 6,6, alícuotar y conservarlo en congelación a -20°C hasta su posterior análisis.
- Obtención de suero de calostro por coagulación enzimática de calostro fresco: añadir zimógeno al calostro (proporción 1: 17.000), mantener la mezcla a 35°C durante 40 minutos, centrifugar a 3000 g, durante 15 minutos a 4°C. Recuperar el sobrenadante y guardar una alícuota. Centrifugar la cantidad restante a 12000g durante 15 minutos a 4°C. Recuperar el sobrenadante, alícuotar y conservar en congelación a -20°C hasta su posterior análisis
- Obtención de suero de calostro mediante centrifugación a partir de calostro mantenido en congelación. Descongelar el calostro y diluir con PBS (proporción 1:1). Centrifugar a 3000g durante 15 minutos a 4°C. Retirar la capa de grasa de la superficie. Recuperar el sobrenadante, separar una alícuota para su análisis y centrifugar la cantidad restante a 12000g durante 15 minutos a 4°C. Recuperar el sobrenadante y analizarlo.

Uno de los objetivos de este trabajo era valorar la evolución de la inmunidad humoral frente a *Anaplasma ovis* desarrollada en las ovejas desde el inicio de la infección experimental y abarcando un periodo que incluyese la gestación, parto y post-parto, ya que este estudio no había sido realizado con anterioridad. Por este motivo, además de llevar a cabo la detección de anticuerpos frente a *Anaplasma ovis* en los sueros de las ovejas recogidos durante el periodo experimental de este trabajo, también se han analizado los obtenidos durante la realización del TFG previo. Estos sueros estaban almacenados en congelación a -20°C desde que las muestras de sangre sin anticoagulante fueron recogidas y procesadas en los días 0, 4, 8, 12, 16, 23, 30, 37, 44, 51, 58, 67, 86, 100, 114 y 143 tras la infección experimental.

Es necesario mencionar que si bien el periodo experimental de este TFG comienza en septiembre de 2015, para hacer más comprensible la interpretación de los resultados, también se van a utilizar los datos de los análisis hematológicos y de detección de *A. ovis* mediante qPCR obtenidos desde el comienzo de la infección experimental, en mayo de 2015, y que ya habían sido presentados en el TFG anteriormente citado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

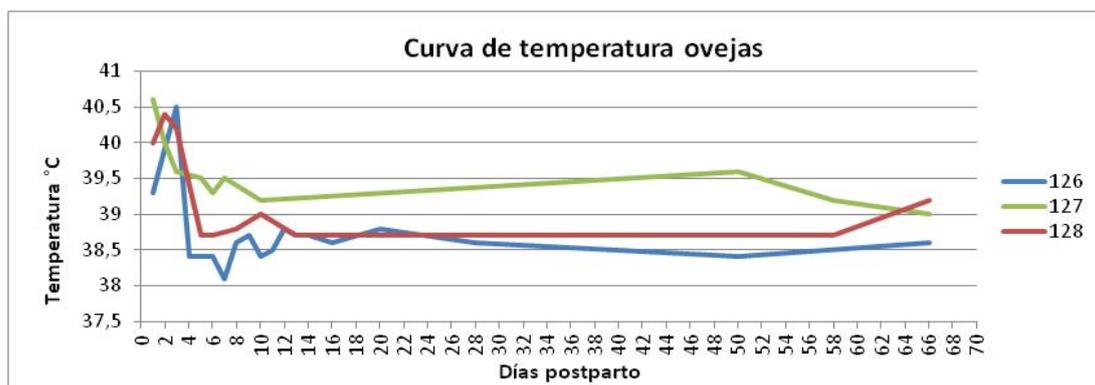
### Evolución clínica y respuesta inmunológica de las ovejas frente a *Anaplasma ovis* desde el momento de la infección experimental hasta el periodo post parto.

#### 1. Evolución clínica de la enfermedad.

Durante la exploración clínica realizada a las tres ovejas periódicamente antes del parto todos los parámetros evaluados (condición corporal, temperatura, coloración de las mucosas, auscultación respiratoria, cardíaca, movimientos ruminales y valoración del tamaño de los linfonodos) fueron normales.

Sin embargo, a partir del momento del parto, durante la exploración física general realizada diariamente, se observaron importantes cambios. Tras el parto, las tres ovejas mostraron gran debilidad, atonía ruminal y fiebre. Este cuadro agudo, que coincide con el referido por los veterinarios clínicos en el brote de anaplasmosis ovina acaecido en la comarca del Matarraña, fue similar al descrito por Hornok y colaboradores durante la infección por *A. marginale* en la fase aguda de la anaplasmosis bovina (Hornok et al., 2012).

Cuando se realizó la infección experimental las ovejas mostraron ligeros picos de aumento de la temperatura, que en ningún momento llegaron a ser febriles, por tanto, los picos febriles tuvieron lugar por primera vez tras el parto. Durante los días uno y dos postparto, los tres animales recuperaron la motilidad ruminal, mientras que el estado febril se mantuvo durante cuatro días (Gráfica 1). Estos picos de fiebre coinciden con los citados en la revisión bibliográfica sobre todas las bacterias del género anaplasma realizada por Rymaszewska y Grenda en 2008. Tal y como se describe en la bibliografía, estos síntomas podrían ser consecuencia del estrés que supone el parto en estos animales, que son portadores asintomáticos (Renneker et al., 2013).



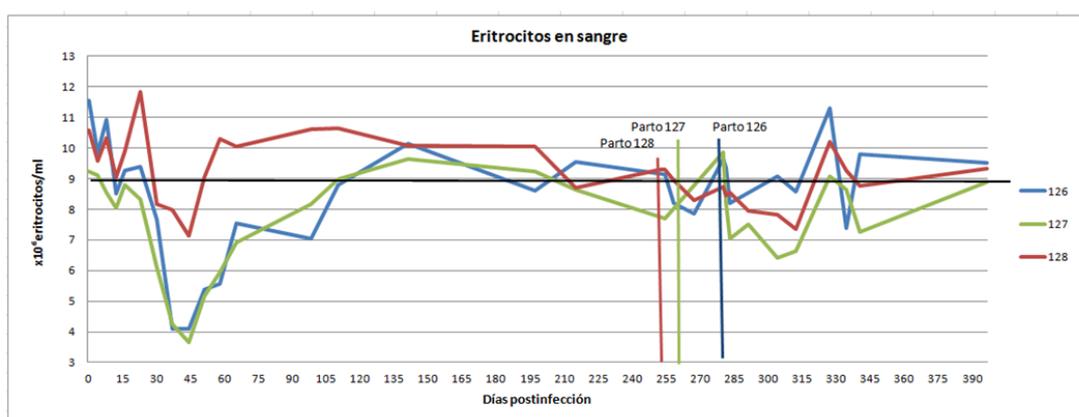
Gráfica 1: Evolución de la temperatura corporal de los tres animales a lo largo del estudio.

Progresivamente, en los días posteriores al parto, se fue desarrollando un cuadro crónico similar al citado en la bibliografía (*Rymaszewska y Grenda, 2008*), caracterizado por una relevante pérdida de condición corporal que evolucionó hacia un estado caquético, pérdida de lana, gran debilidad y palidez de las mucosas. El cambio fisiológico que supone el final de la gestación, el parto y la lactación, así como el estrés generado a consecuencia del parto, posiblemente desencadenaron un rebrote de la enfermedad, que dio lugar al cuadro clínico más grave. Estos hallazgos están en concordancia con los descritos por Alessandra y Santo (2012) en un estudio sobre aspectos clínicos y diagnósticos de enfermedades propias de ovino y caprino transmitidas por garrapatas, en el que se tomaron muestras para serología y pruebas moleculares en casos de infecciones producidas por *A. ovis*, *A. phagocitophilum*, *Babesia* y *Theileria* en el sur de Italia desde 2004 hasta el 2009. Este cuadro no se desarrolló de forma tan acusada en la oveja 126, cuyo parto fue prematuro.

## 2. Análisis hematológicos y recuento diferencial de leucocitos.

Los datos de la evolución del recuento de eritrocitos a lo largo de los dos periodos de estudio se muestran en la Gráfica 2. El rango normal para ovino es  $9-14 \times 10^6$  eritrocitos/ml. Tras la infección experimental, tuvo lugar el desarrollo de una anemia muy severa detectada entre los días 8 y 12 post-infección, la cual, tras recuperar los animales valores hematológicos normales, volvió a verse reflejada en un segundo pico entre los días 30 y 44, no volviendo a recuperar valores normales hasta pasados dos meses de la infección (Jiménez, 2015). Tal y como se describe en un estudio realizado por *Ciani et al.* (2013), los animales pueden sobrevivir a la fase aguda de la enfermedad y algunos pueden llegar a superarla sin necesidad de tratamiento. El recuento de eritrocitos se mantuvo dentro de los valores normales tras la superación de la enfermedad inducida por la infección experimental y durante toda la gestación. Sin embargo, los cambios en este parámetro volvieron a observarse alrededor del parto.

En el animal 128 el número de eritrocitos fue disminuyendo gradualmente tras el parto, comenzando a mostrar anemia en torno al quinto día postparto, la cual se prolongó durante 80 días. A partir de ese momento, el número de eritrocitos se mantuvo dentro de la normalidad. Sin embargo, en la oveja 127, la anemia reapareció antes, en torno a los 205-220 días post-infección, es decir, durante el último tercio de gestación, siendo el valor del número de eritrocitos progresivamente inferior hasta el día 70 postparto, en el que comenzó a aumentar de nuevo. Sin embargo, al concluir el estudio esta oveja todavía no había recuperado valores normales. Por último, el animal 126, el menos afectado por los signos clínicos asociados, comenzó a mostrar anemia el tercer día postparto, de la cual se recuperó dos meses después (día 340 post-infección). En ninguno de los tres animales el grado de anemia fue tan grave como el sufrido después de la infección experimental.

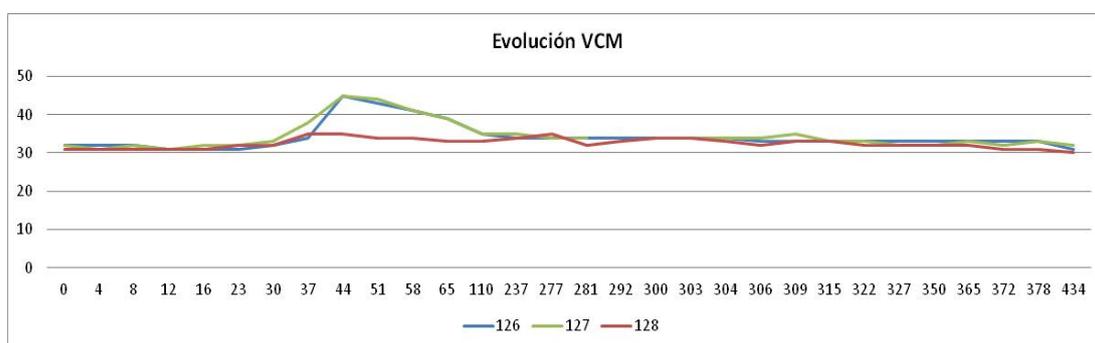


Gráfica 2. Evolución del número de eritrocitos desde el día 1 tras la infección experimental hasta el día 450 post-infección (las líneas verticales indican la fecha de parto de cada una de las tres ovejas y la línea negra horizontal indica el límite inferior del rango normal del número de eritrocitos/ml en ovino).

Para evaluar la evolución del tipo de anemia sufrida por los animales se analizaron el VCM (Volumen Corpuscular medio), indicativo del tamaño de los eritrocitos, y la CMHC (concentración media de hemoglobina corpuscular). Los resultados obtenidos se muestran en la Gráfica 3. El VCM aumento por encima de los valores normales ( $28-42\mu\text{m}^3$ ) en las ovejas 126 y 127 en torno al día 40 post-infección, lo cual indica que se desarrolló una intensa respuesta regenerativa con un aumento de la producción de formas inmaduras de glóbulos rojos (reticulocitos) que tienen mayor tamaño. Por lo que la anemia se califica como macrocítica. Por lo tanto, al principio la anemia en estos animales fue de tipo normocítico y normocrómico (valores de CMHC dentro del rango de normalidad), la cual se tornó macrocítica y normocrómica. Este aumento en el valor del VCM se produjo una semana después del pico máximo de anemia y se normalizó a la vez que el recuento de eritrocitos. Este hecho coincide con los resultados obtenidos en la infección experimental llevada a cabo por Yasini et al. en 2012. En cambio, en el caso del animal 128, la anemia fue de tipo normocítica y normocrónica

al principio y posteriormente normocítica e hiperocrómica. En este animal la anemia fue menos marcada, y para compensar la disminución de oxígeno a nivel sanguíneo, tan solo tuvo lugar un aumento de la concentración de hemoglobina y no un aumento del número de reticulocitos (Jiménez, 2015).

Durante el rebrote de la enfermedad que tuvo lugar tras el parto, con la anemia consiguiente ninguno de los animales mostró variaciones en los valores de VCM y CMHC, probablemente debido a que el grado de anemia fue menor. En este caso, y coincidiendo con lo encontrado en la bibliografía, la anemia fue de tipo normocítico–normocrómico (Yasini *et al.*, 2012).

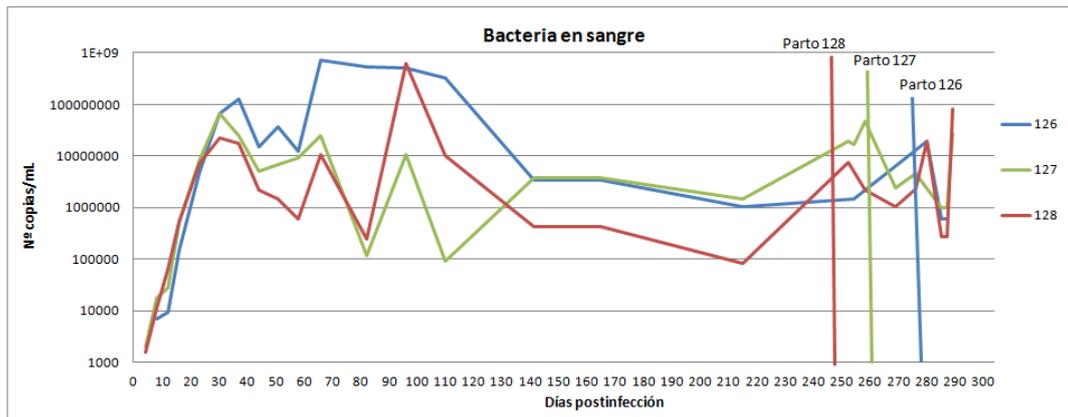


Gráfica 3: Evolución del valor de VCM en las ovejas 126, 127 y 128

Con respecto al recuento total y diferencial de leucocitos, durante la gestación no se observaron cambios significativos en ninguno de los tres animales. Sin embargo, el día del parto, en las tres ovejas se produjo un descenso en el porcentaje de linfocitos acompañado de un aumento en el porcentaje de neutrófilos y monocitos. Los días posteriores al parto los valores de la fórmula leucocitaria recuperaron la normalidad y así se mantuvieron durante el resto del estudio. Este cambio puntual observado se corresponde con un perfil leucocitario indicador de estrés (Davis *et al.*, 2008) que estaría provocado por el parto.

### 3. Resultados de la PCR Cuantitativa frente a *Anaplasma ovis*

Respecto a los resultados de la qPCR cuantitativa frente a *A. ovis*, se consideran positivas aquellas muestras que posean un valor de Cq menor o igual a 38, siendo Cq el número de ciclos al que se somete la muestra para alcanzar una cantidad de ADN bacteriano amplificado determinada. Dado que la qPCR empleada es de tipo cuantitativo, fue también posible establecer una curva en la que se observa la evolución de la carga bacteriana de *A. ovis* en sangre desde el inicio de la infección experimental hasta la finalización del estudio (Gráfica 4).



Gráfica 4: evolución de la carga bacteriana en las ovejas 126, 127 y 128 desde el inicio de la infección experimental hasta el día 312 post-infección (las líneas verticales indican el momento del parto de cada una de las ovejas).

Las ovejas 127 y 128 resultaron positivas a la qPCR el día 5 post-infección, mientras que la 126, no lo fue hasta el día 10. Estos datos coinciden con los resultados obtenidos en el trabajo de *Ciani et al.* en 2013, en el cual, se detecta la presencia de la bacteria en sangre a los 7 días, tras el primer pico de fiebre. A partir de este momento, los tres animales sufrieron un progresivo incremento de la carga bacteriana hasta alcanzar el pico de bacteriemia en torno al día 30 post infección en los animales 127 y 128, y algunos días más tarde en la 126. En todos los animales se observó una semana de separación entre el pico de anemia y el pico de bacteriemia (Jiménez, 2015). Tras el pico de bacteriemia, la carga bacteriana disminuyó gradualmente, sin embargo, en torno al día 70, en los tres animales se produjo una reactivación alcanzando un pico de bacteriemia superior al anterior en el animal 126 y similar en el caso de los otros dos (127 y 128), siendo la oveja 126, con una mayor cantidad de bacterias por ml al principio, la que sufrió un repunte más alto. Sin embargo, durante este segundo pico de bacteriemia los parámetros hematológicos continuaron con su recuperación, por tanto, la respuesta regenerativa del organismo compensó la hemólisis o no fue tan intensa en esta ocasión (Jiménez, C. 2015).

Posteriormente, tal y como se puede observar en la Gráfica 4, en el animal 126 la carga bacteriana comenzó a disminuir lentamente, mientras que en las otras dos ovejas, en torno al día 100, tiene lugar un tercer pico de bacteriemia, siendo inferior a los anteriores en el caso del 127 y superior en el caso del 128. Tras este tercer pico, la carga bacteriana disminuye en todos los animales, tal y como se describe en la bibliografía. Sin embargo, ninguno de ellos eliminó completamente la infección, manteniéndose una carga bacteriana residual y constante hasta el final de la gestación. Según Suarez y Noh (2011), se produce una infección permanente porque la bacteria consigue evadir la respuesta inmune del hospedador debido a variaciones antigénicas en las proteínas de su membrana externa. Pese a la elevada carga bacteriana

detectada en estos animales, durante este primer periodo de estudio, ninguno de ellos mostró signos clínicos más allá de la anemia.

En los tres animales, 126, 127 y 128, la carga bacteriana comenzó a aumentar en el último mes de gestación, alcanzando un nuevo pico de bacteriemia en el momento del parto y tras este pico, el número de bacterias en sangre descendió de nuevo. El pico alcanzado por la oveja 128 (parto día 252 post-infección) fue una unidad logarítmica inferior al alcanzado por la oveja 127 (parto día 258 post-infección) y el pico alcanzado por la oveja 126 (parto día 280 post-infección) fue algo superior al alcanzado por la oveja 128 e inferior al de la oveja 127. Además, en la oveja 126, la carga bacteriana descendió inmediatamente tras el parto, no sucediendo lo mismo en las ovejas 127 y 128. En el animal 128 se producen dos nuevos picos de bacteriemia en los días 20 y 40 días postparto, y en el 127 tiene lugar un segundo pico en torno al día 30 postparto. En cualquier caso, y tal y como se cita en la bibliografía, en las tres ovejas tuvo lugar una reactivación de la infección en torno al parto. Tanto el estrés como los cambios fisiológicos acontecidos en este momento pueden conllevar al rebrote de la enfermedad (*Alessandra y Santo, 2012*). Además, Lopo et al. (2016) recogen que, en casos de anaplasmosis bovina producida por *A. marginale*, la inmunosupresión transitoria que tiene lugar durante el periparto puede conllevar a la reactivación del proceso.

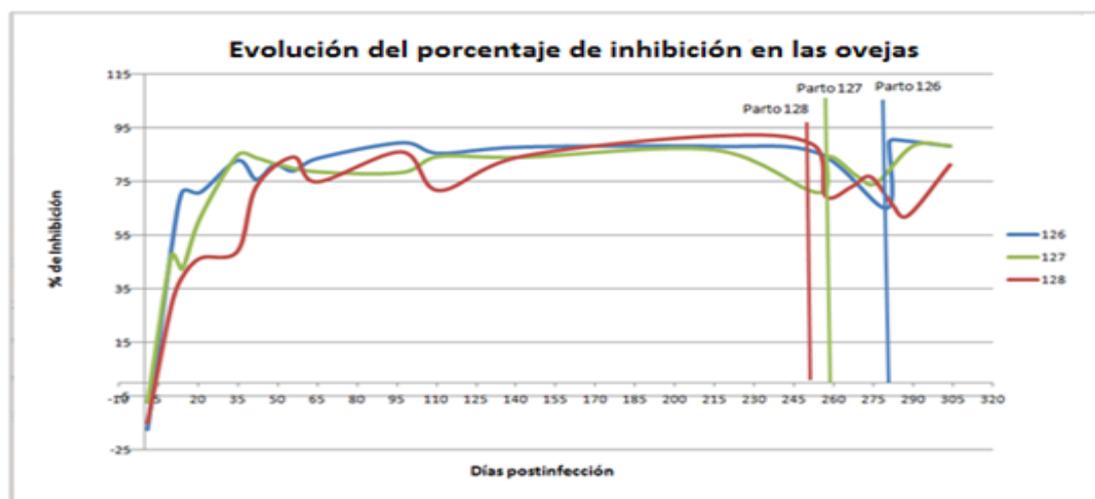
#### **4. Resultados de la detección de anticuerpos mediante cELISA**

En el presente estudio analizamos la presencia de anticuerpos frente a *A. ovis* y su evolución mediante la técnica de cELISA desde el momento de la infección experimental hasta el día 304 post infección.

Tal y como se observa en la Gráfica 5, en torno al día 10 post infección, en las tres ovejas, fue ya posible la detección de anticuerpos frente a la bacteria *A. ovis*. A partir de esa fecha los porcentajes de inhibición medidos aumentaron progresivamente hasta alcanzar un valor del orden del 80-90%, que se mantuvo en el tiempo. Es necesario señalar que si bien la técnica no permite una cuantificación del título de anticuerpos presentes en la muestra, la obtención de un porcentaje de inhibición elevado indicaría que los anticuerpos anti *A. ovis* de la muestra son capaces de inhibir en una proporción elevada la reacción que se produce con el control negativo, carente de anticuerpos. Las ovejas 126 y 127, en torno al día 35 post infección alcanzaron un elevado porcentaje de inhibición, mientras que la oveja 128 alcanzó estos valores en torno al día 56 post infección. Durante la gestación, las tres ovejas mantuvieron un porcentaje de inhibición elevado, sin embargo, en torno al parto, en las tres tuvo lugar un descenso en el porcentaje de inhibición, el cual pudo ser debido al estrés y a los cambios

fisiológicos que tienen lugar hacia el final de la gestación y durante el parto (Alessandra y Santo, 2012) y a la inmunosupresión transitoria que se produce en las hembras durante el periparto, tal como se indica en el reciente estudio realizado por Lopo et al. (2016) sobre anaplasmosis bovina. No obstante, en el animal 126, inmediatamente tras el parto se produjo un aumento importante del porcentaje de inhibición. Tal y como se ha indicado anteriormente, este animal tampoco presentó grandes cambios clínicos tras el parto ni una elevada carga bacteriana lo cual podría estar relacionado con una buena respuesta inmunológica por parte de este animal frente a la bacteria, que redundaría en una mejor recuperación de todos los parámetros. En la oveja 127 el aumento del porcentaje de inhibición tuvo lugar unos 30 días postparto, en cambio, en la 128 este aumento no se produjo hasta el día 50 tras el parto. Este animal fue el que presentó una clínica más acusada, por lo que esta respuesta tardía a la bacteria podría indicar una respuesta inmune menos eficiente. Estos resultados nos podrían llevar a especular, siempre teniendo en cuenta las limitaciones de la técnica utilizada, que la respuesta inmune humoral podría jugar un papel importante en la defensa frente a esta bacteria.

En cualquier caso, en los tres individuos se detectaron anticuerpos 10 días tras la infección experimental, lo cual se aproxima a los resultados obtenidos en el estudio realizado por Brown en 2012, en el cual se afirma que los anticuerpos se producen a las dos semanas de la infección y disminuyen conforme pasa el tiempo, desapareciendo al cabo de 12 semanas. Esta última afirmación no coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que, como se muestra en la siguiente gráfica, la presencia de anticuerpos se mantiene durante al menos 10 meses (periodo de tiempo analizado).



Gráfica 5: evolución del porcentaje de inhibición mediante cELISA en las ovejas 126, 127 y 128 desde el inicio de la infección experimental hasta el día 330 post infección (las líneas verticales indican el momento de parto de cada una de las ovejas).

### **1. Exploración clínica.**

Fruto del parto de la oveja 126, nacieron dos corderos (mortinato y cordero número 94), uno de ellos murió instantes tras el nacimiento y el segundo, cinco días después. En un estudio realizado por Lopo et al., (2016) sobre la transmisión vertical de *A. marginale* en el ganado bovino, algunos de los terneros nacieron apáticos, con hipotermia y palidez de las mucosas, incluso uno de ellos presentó ictericia, estos terneros murieron 24 horas post parto. En este estudio todos los terneros fueron PCR positivos frente a *A. marginale* tras el parto, sin embargo, como veremos posteriormente, los corderos de nuestro estudio resultaron PCR negativos frente a *A. ovis*.

Se realizó la necropsia de ambos animales para su estudio anatomopatológico. El primero de ellos presentaba hidronefrosis, abundante mucosidad en abomaso y fuerte congestión en encéfalo. Los hallazgos de necropsia del cordero 94 fueron retención de meconio, coloración amarillenta de las asas intestinales, edema pulmonar y toxemia. La muerte de ambos animales probablemente estuvo determinada por el nacimiento prematuro de los mismos.

Los partos de las ovejas 127 y 128 acontecieron de forma normal. Ambas parieron dos corderos cada una, los cuales no mostraron ningún síntoma de enfermedad y su crecimiento se desarrolló conforme a lo esperado. En la bibliografía también se describe el nacimiento de terneros sanos, descendientes de vacas PCR positivas a *A. marginale*, y cuyo crecimiento tuvo lugar de una forma adecuada (Lopo et al., 2016). En nuestro caso, la ausencia de síntomas de enfermedad en los corderos está en concordancia con los resultados negativos a la qPCR frente a *A. ovis* en estos corderos.

### **2. Resultados de la PCR Cuantitativa frente a *Anaplasma ovis***

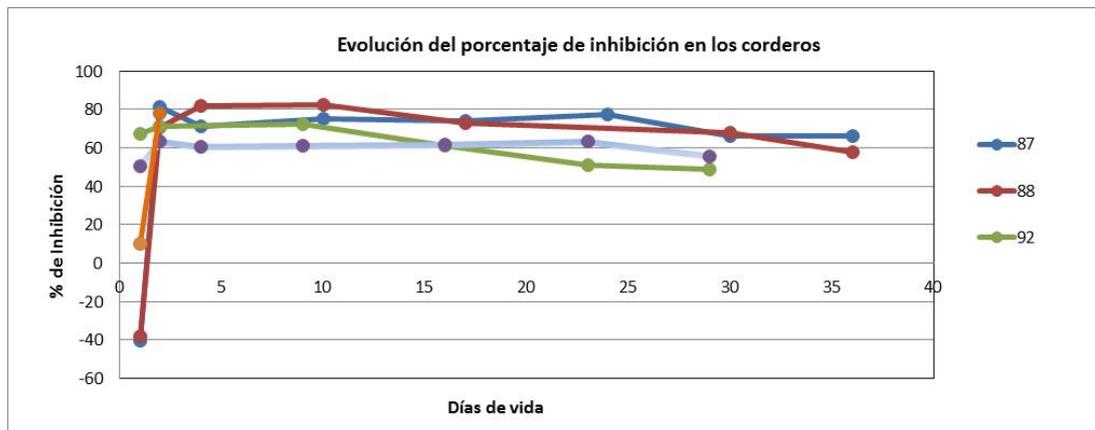
Respecto a la qPCR realizada sobre las muestras de sangre entera de los corderos extraídas los días 0, 1, 3, 10, 17, 24 y 31 de vida de los animales se observa que, tanto las muestras obtenidas previamente a la toma de calostro (toma 0), como las obtenidas tras la ingesta del mismo (todas las demás), muestran resultados negativos a la PCR frente a *A. ovis*. Por tanto, en el presente estudio y teniendo en cuenta la limitación que supone trabajar únicamente con tres animales, no se ha podido demostrar la transmisión vertical de la bacteria *A. ovis*, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos en el trabajo realizado sobre la transmisión transplacentaria de *A. marginale* por Kutter, en 1984, en el que se concluye que tal vía de transmisión no tiene lugar. Sin embargo, son otros muchos los estudios realizados con *A.*

*marginale* que afirman que esta forma de transmisión sí es posible (Fowler y Swift, 1975; Swift y Paumer, 1976, 1978; Zaugg y Kuttler, 1984; Zaugg, 1985; Potgieter y Vanrensburg, 1987; Ribeiro et al., 1995; Maldonado et al., 2012; Grau et al., 2013; Silva y Fonseca 2014; Silva et al., 2015; Lopo et al, 2016). Sobre la anaplasmosis ovina no han sido realizados estudios de transmisión transplacentaria de *A. ovis* por el momento.

Lopo et al, en 2016 concluyen que la transmisión transplacentaria de la bacteria *A. marginale* podría variar en función de la región, de las condiciones climáticas, del animal, de factores inmunosupresores, de la presencia de vectores y de la variabilidad genética del agente (Lopo et al., 2016), de modo que, basándonos en nuestro reducido estudio, no podemos afirmar con rotundidad que *A. ovis* no se transmite de las madres a los corderos por vía transplacentaria, ya que son muchos los factores que podrían influir en dicho proceso.

### 3. Resultados de la detección de anticuerpos mediante la técnica de ELISA.

En la siguiente gráfica (Gráfica 6) se muestran los resultados de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos frente a *A. ovis* en los sueros de los corderos.



Gráfica 6: evolución del porcentaje de inhibición frente a *A. ovis* mediante cELISA en los corderos nacidos de madres infectadas.

Los corderos 87 y 88, nacidos de la oveja 128 y el cordero 94 y el mortinato, nacidos de la 126, no presentaron anticuerpos frente a *A. ovis* al nacimiento previamente a la toma de calostro (Tabla 2). Fue en la primera toma de muestras tras la ingesta de calostro, cuando se comenzaron a detectar, de modo que parece claro que en estos corderos, la transmisión de anticuerpos se produjo vía calostro, como es habitual en la especie ovina. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el estudio llevado a cabo en el sur de Brasil por Grau et al en 2013 sobre anaplasmosis bovina producida por *A. marginale*.

Cordero	87								88								94		Mortinato
Día de vida	0	1	3	10	17	24	30	36	0	1	3	10	17	30	36	0	1	0	
% Inhibición	-41	81	72	75	74	77	66	66	-38	71	82	83	73	68	58	10	78	10	

Tabla 2: evolución en porcentaje de inhibición obtenido en la prueba de cELISA para los corderos 87, 88, 94 y mortinato antes y después de la toma de calostro (día 1 de vida).

En cambio, las muestras de suero de los corderos 92 y 93, hijos de la oveja 127, tomadas tras el nacimiento y, supuestamente previa ingesta de calostro, ya presentaban anticuerpos frente a la bacteria. Lo cual puede deberse a diversos motivos; el primero de ellos es que los corderos tomaran calostro inmediatamente tras el parto y antes de extraer las muestras de sangre, debido a que el coloide puesto en los pezones de la oveja para sellarlos no ofreciese el resultado esperado. Este hecho es posible, ya que el parto tuvo lugar durante la noche y no estuvimos presentes en el mismo, por tanto, se desconoce si estos corderos ingirieron calostro antes de la primera extracción sanguínea. Otra posible causa del resultado obtenido es que los corderos realmente presentasen anticuerpos al nacimiento, lo cual ha sido evidenciado en dos estudios: en el llevado a cabo por Grau et al. (2013), en el cual, el 10% de los terneros descendientes de vacas con infección crónica presentaban anticuerpos frente a *A. marginale* al nacimiento, previamente a la toma de calostro y en el estudio realizado en el norte de Brasil por Lopo et al. (2016), en el que el 26,4% de los terneros presentaron anticuerpos frente a *A. marginale* antes de ingerir calostro. Además, Zaugg (1985) describe la infección intrauterina temporal de *A. marginale*, lo que genera una respuesta inmune en el recién nacido, convirtiéndose éste en un posible reservorio de la infección en aquellas situaciones en que la carga bacteriana es elevada y el feto no es capaz de eliminar la infección.

Identificación	92						93						
Día de vida	0	1	9	16	23	29	0	1	3	9	16	23	29
% de Inhibición	68	71	72	61	51	49	50	63	61	61	62	64	56

Tabla 3: evolución en el porcentaje de inhibición de los corderos 92 y 93 antes y después de la toma de calostro en el día 1 de vida.

En el análisis mediante la prueba de cELISA de la presencia de anticuerpos frente a *A. ovis* en el calostro tomado inmediatamente tras el parto, se obtuvieron los resultados mostrados en la [Tabla 4](#), siendo todas las muestras positivas y evidenciándose de ese modo la presencia de anticuerpos en el calostro de las tres ovejas infectadas por *Anaplasma ovis*. No obstante, los valores obtenidos para cada animal difieren en función de la eficacia del procedimiento utilizado para procesar la muestra de calostro.

Calostro	128 C1	128 C2	127 C1	127 C2	126 C1	126 C2	126 A1	126 A2	126 E1	126 E2
% Inhibición	85	73	83	64	62	84	68	74	78	88

Tabla 4: porcentajes de inhibición obtenidos al analizar mediante cELISA los calostros de las ovejas 126, 127 y 128.

A1: suero de calostro obtenido mediante coagulación ácida y un paso de centrifugación

A2: suero de calostro obtenido mediante coagulación ácida y dos pasos de centrifugación

E1: suero de calostro obtenido mediante coagulación enzimática y un paso de centrifugación

E2: suero de calostro obtenido mediante coagulación enzimática y un dos pasos de centrifugación

C1: suero de calostro obtenido mediante congelación y un paso de centrifugación

C2: suero de calostro obtenido mediante congelación y dos pasos de centrifugación

Siendo que la detección de anticuerpos frente a *A. ovis* fue positiva tanto en el calostro como en el suero de los corderos obtenido en los muestreos post-calostrales, podemos concluir que las ovejas, positivas a *A. ovis* tras la infección experimental y habiendo mantenido carga bacteriana en sangre hasta después del parto, generaron anticuerpos frente a la bacteria que fueron transferidos vía calostro a sus corderos, proporcionando de este modo inmunidad frente a la enfermedad durante los primeros meses de vida. En estos corderos, nacidos de ovejas infectadas, no se detectó la presencia de *Anaplasma ovis*, pero sí presentan anticuerpos frente al germen. Sería de gran interés realizar estudios posteriores, en los que se determinara hasta qué momento se mantiene esta inmunidad y si sería suficiente para proteger a estos animales frente a infección posterior. Es conocida la generación de inmunidad natural a nivel de campo según la enfermedad se va haciendo endémica en la zona. La transmisión de inmunidad vía calostro podría contribuir a explicar esta resistencia en infecciones tempranas.

## CONCLUSIONES

Respecto al desarrollo clínico y la respuesta inmunológica frente a la anaplasmosis ovina se han extraído las siguientes conclusiones:

1. Los animales, tras la infección experimental, pueden llegar a superar la enfermedad sin necesidad de tratamiento. Sin embargo, no son capaces de eliminar completamente la infección, quedando como portadores asintomáticos, haciendo posible el rebrote de la enfermedad y un aumento en la carga bacteriana, que se ve favorecido por cambios fisiológicos o factores estresantes e inmunosupresores, como el parto.
2. Los animales infectados experimentalmente comienzan a desarrollar anticuerpos frente a *Anaplasma ovis* en torno al día 10 post-infección, los cuales se mantienen durante, al menos, 10 meses.

Por otro lado, tras los resultados obtenidos de las diversas pruebas llevadas a cabo para determinar la posible transmisión vertical de la bacteria *A. ovis* y la transferencia de anticuerpos a través del calostro se concluye que:

1. En el presente estudio, no se ha producido transmisión vertical de *A. ovis*. Pese a ello, no podemos afirmar rotundamente que dicha vía de transmisión no sea posible, puesto que solamente se han estudiado tres animales.
2. Existe transferencia de anticuerpos frente a *A. ovis* de la madre a los corderos a través del calostro. Los corderos no presentaron anticuerpos frente a la bacteria previamente a la toma de calostro, pero sí tras la ingesta del mismo. Además, se ha detectado la presencia de anticuerpos en el calostro de las ovejas objeto de estudio.

## CONCLUSIONS

Regarding the development and evolution of ovine anaplasmosis, the following conclusions have been extracted:

The animals, after experimental infection, can overcome the disease without treatment. However, they are not able to completely eliminate the infection, keeping as asymptomatic carriers, making possible the re-emergence of the disease and an increase in bacterial load, which is favored by physiological changes or stressors and immunosuppressants, such as lambing. Animals infected experimentally start developing antibodies against *Anaplasma ovis* on the day 10 post-infection, which are maintained during, at least, 10 months.

On the other hand, after the results of the various tests carried out to determine the possible vertical transmission of the bacteria *A. ovis* and transfer of antibodies via colostrum it is concluded that:

In the present study, there has not been vertical transmission of *A. ovis*. Nevertheless, we cannot say categorically that this route of transmission is not possible, since only three animals have been studied. There is transfer of antibodies against *A. ovis* from mother to the lambs through colostrum. Lambs had not antibodies against the bacterium previously to the colostrum intake, but they had after the ingestion. In addition, the presence of antibodies in the colostrum of the studied sheep has been detected.

## VALORACIÓN PERSONAL

Gracias a la realización del este trabajo, además de aprender sobre esta enfermedad, he sido consciente del desconocimiento que existe sobre ella y de la importancia que está adquiriendo, dada la continua aparición de nuevos casos en nuestro país y las pérdidas

económicas que supone. Por tanto, es necesario seguir investigando sobre ello, para así poder resolver el problema algún día.

Creo que este trabajo, de una forma muy modesta, puede arrojar algo de luz sobre la evolución de esta enfermedad y sobre su futuro. Por ello, el esfuerzo ha merecido la pena y se han obtenido resultados interesantes. Indudablemente, este estudio, tiene limitaciones derivadas de mi desconocimiento sobre ciertos temas y sobre la investigación científica, de manera que todavía me queda un gran camino de constante aprendizaje por recorrer.

Por último quiero agradecer a Delia Lacasta y a Aurora Ortín la oportunidad de poder realizar este trabajo, y su paciencia, también a José Calasanz Jiménez por su ayuda en el trabajo diario de laboratorio y por compartir conmigo su conocimiento sobre esta enfermedad y algunos de los datos y muestras tomadas por él durante el desarrollo de su trabajo fin de grado. Finalmente a Sergio Villanueva por su colaboración en la realización de la prueba ELISA.

## **BIBLIOGRAFÍA.**

- Alessandra, T., Santo, C. (2012). Tick-borne diseases in sheep and goats: Clinical and diagnostic aspects. *Small Ruminant Research*, 106, 6–11.
- Bautista G. (1996). La respuesta inmune celular en anaplasmosis bovina. *Ciencia Veterinaria*, 7(24), 315–329.
- Bevan, L. E. W. (1912). Anaplasmosis of sheep. *Veterinary Journal*, 68, 400- 401.
- Brayton, K. A. (2012). Transmisión de *Anaplasma marginale* por garrapatas. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3 (Supl 1): 41- 50.
- Brown, W. C. (2012). Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: Implications for bacterial persistence. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35, 241– 252.
- 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 Veterinaria Scandinavica*, 55, 71.
- Corona. B, (2004). Anaplasmosis bovina. *REDVET*, 4 (4), 655–667.
- Davis, A.K., Maney, D.L. Maerz, J.C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologist. *Functional Ecology*, 22, 760-772.
- Derdáková, M., Štefančíková, A., Špitalská, E., Taragel'ová, V., Košťálová, T., Hrk'lová, G., Peřko, B. (2011). Emergence and genetic variability of *Anaplasma* species in small ruminants and ticks from Central Europe. *Veterinary Microbiology*, 153(3-4), 293–298.

- Fernández, A.S., Padola, N. L., Estein, S. M. (1994). El calostro, fuente de transferencia de la inmunidad materna. Sitio argentino de producción animal. Recuperado: 02/06/2016. [http://www.produccionbovina.com/informacion\\_tecnica/cria\\_amamantamiento/01-calostro.pdf](http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/cria_amamantamiento/01-calostro.pdf)
- Fowler, D., Swift, B. L. (1975). Abortion in cows inoculated with *Anaplasma marginale*. *Theriogenology*, 4, (2-3), 59-67.
- Grau, H. E. , Cunha Filho, N. A., Pappen, F.G., Farias, N.A. (2013). Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitología Veterinaria*, 22(2), 189-93.
- 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. *Veterinary Microbiology*, 122, 316–322.
- Hornok, S., Földvári, G., Elek, V., Naranjo, V., Farkas, R., de la Fuente, J. (2008). Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 154, 354–359.
- Hurtado, A., Barandika, J. F., Oporto, B., Minguijón, E., Povedano, I., & García-Pérez, A. L. (2015). Ticks and Tick-borne Diseases Risks of suffering tick-borne diseases in sheep translocated to a tick infested area : A laboratory approach for the investigation of an outbreak. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 6(1), 31–37.
- Jiménez, J.C., (2015). Estudio sobre la anaplasmosis ovina en la Comarca del Matarraña (Teruel). Infección experimental con *Anaplasma ovis*. Trabajo Fin de Grado. Facultad de Veterinaria de Zaragoza.
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., Ewing, S., (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitology*, 167(2-4), 95–107.
- Kuttler K. L. (1984). *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants. *The Journal of Wildlife Diseases* J Wildl Dis 20(1), 12-20.
- Little, S. E. (2010). Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 40(6), 1121–1140.
- Lopo S. C., Carvalho, V., Volkart, U., Santos, F., Pereira, C., Zacarias, R., Dias Munhoz, A. (2016). Transplacental transmission of bovine tick-borne pathogens: Frequency, co-infections and fatal neonatal anaplasmosis in a region of enzootic stability in the northeast of Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7 (2), 270-275.
- Norton, J.H., Parker, R. J., Forbes-Favlnkner, J. C. (1983). Neonatal anaplasmosis in a calf. *Australian Veterinary Journal*. 60 (11), 348.

- Maldonado, J., Coronado, A., Kowalski, A., Medina, J. (2012). Molecular evidence of transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in zebu neonatal calves of Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 30 (1), 109-114.
- OIE. (2012). Bovine Anaplasmosis. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, VI (May), 589–600.
- Palacios, C., Torioni, S., Mattion, N. (2014). Evaluation of the immune response to *Anaplasma marginale* MSP5 protein using a HSV-1 amplicon vector system or recombinant protein. *Research in Veterinary Science*, 97, 514–520.
- Potgieter, F.T., Van Rensburg, L. (1987). The persistence of colostral *Anaplasma* antibodies and incidence of in utero transmission of *Anaplasma* infection in calves under laboratory condition. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*. 54, 557–560.
- Pypers, A.R., Holm, D.E., Williams, J.H., (2011). Fatal congenital anaplasmosis associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in crossbred calf. *Journal of the South African Veterinary Association*, 82, 179–182.
- Ramos, J.J.; Ferrer, L.M.; Lacasta, D.; Figueras, L.; Callejas, M. (2006). La importancia del calostro para los corderos y cabritos recién nacidos. *Informaciones Técnicas de la Dirección General de Desarrollo Rural del Centro de Transferencia Agroalimentaria. Gobierno de Aragón*, Nº 169.
- Rar, V., Golovljova, I. (2011). *Anaplasma*, Ehrlichia, and “*Candidatus Neoehrlichia*” bacteria: Pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(8), 1842–1861.
- 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?. *Transboundary and Emerging Diseases*, 60(2), 105–112.
- Ribeiro, M.F.B., Lima, J.D., Guimarães, A.M., Scatamburlo, M.A., Martins, N.E., (1995). Transmissão congênita da anaplasmoze bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 47,297–304.
- Rymaszewska, A.; Grenda, S. (2008). Bacteria of the genus *Anaplasma*—characteristics of *Anaplasma* and their vectors. *Veterinarni Medicina*, 53(11), 573–584.
- Scoles, G. A., Goff, W. L., Lysyk, J., Lewis, G. S., Knowles, D. P. (2008). Validation of an *Anaplasma marginale* cELISA for use in the diagnosis of *A. ovis* infections in domestic sheep and *Anaplasma* spp. in wild ungulates. *Veterinary Microbiology*, 130, 184-190.
- Shkap, V., Kocan, K., Molad, T., Mazuz, M., Leibovich, B., Krigel, Y., Michoytchenko, a., Blouin, E., de la Fuente, J., Samish, M., Mtshali, M., Zwegarth, E., Fleiderovich, E.L., Fish, L. (2009). Experimental transmission of field *Anaplasma marginale* and the *A. centrale* vaccine strain by *Hyalomma excavatum*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* ticks. *Veterinary Microbiology*, 134, 254–260.

- Silva, J. B., Fonseca, A. H., (2014). Risk factors for anaplasmosis in dairy cows during the paripartum. *Tropical Animal Health and Production*, 46, 461–465.
- Silva, J. B., Gonçalves, L. R., Varani, A.M., André, M. R., Machado, R. Z. (2015). Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* studied longitudinally under natural transmission conditions in Rio de Janeiro, Brazil. *Ticks Tick Borne Diseases*, 6, 499–507.
- Suarez, C. E., Noh, S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 180(1-2), 109–125.
- Swift, B. L.; Paumer, R. J. (1976). Vertical transmission of *Anaplasma marginale* in cattle. *Theriogenology*, 6 (5), 515-521.
- Swift, B. L, Paumer, R. J. (1978). Bovine fetal anoxia observed in pregnant beef heifers experimentally inoculated with *Anaplasma marginale*. *Theriogenology*, 10 (5), 395- 403.
- Torina, A., Galindo, R.C., Vicente, J., Di Marco, V., Russo, M., Aronica, V., Fiasconaro, M., Scimeca, S., Alongi, A., Caracappa, S., Kocan, K.M., Gortazar, C., de la Fuente, J. (2010). Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* and *A. ovis* infection in a naturally infected sheep flock with poor health condition. *Tropical Animal Health and Production*, 42, 1327–1331.
- Tuboly, S., Bernáth, S. (2002). Intestinal absorption of colostral lymphoid cells in newborn animals. In: *Biological mechanisms and research methods in the study of human milk and lactation*. David et al., ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers. p 107-114.
- Víchová, B., Majláthová, V., Nováková, M., Stanko, M., Hviščová, I., Pangrácová, L. & Peňko, B. (2014). *Anaplasma* infections in ticks and reservoir host from Slovakia. *Infection, Genetics and Evolution*, 22, 265–272.
- 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. *Iranian Journal of Parasitology*, 7(4), 91–98.
- Zaugg, J. L., Kuttler, K. L. (1984). *American Journal of Veterinary Research*, 45(3):440-443.
- Zaugg, J.L. (1985). Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *American Journal of Veterinary Research*, 46, 570–572.