



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Estudios sobre la anaplasmosis ovina en la comarca del Matarraña (Teruel).

Estudio epidemiológico.

Autor/es

Miguel Lorenzo Fábregas.

Director/es

Delia Lacasta Lozano.

Facultad de Veterinaria

2016

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
5. CONCLUSIONES FINALES	30
6. FINAL CONCLUSSIONS	31
7. VALORACIÓN PERSONAL Y AGRADECIMIENTOS	32
8. BIBLIOGRAFÍA:.....	33

RESUMEN

El presente trabajo fin de grado nace de la necesidad de ampliar los conocimientos existentes sobre la anaplasmosis ovina en España, especialmente en la comarca del Matarraña (Teruel), donde actualmente está causando graves pérdidas económicas a los ganaderos. El objetivo principal de esta investigación es profundizar en la epidemiología de la enfermedad. Este estudio forma parte de una serie de trabajos fin de grado que pretenden proporcionar un conocimiento global sobre la anaplasmosis ovina.

Para la realización de este estudio fueron visitadas 52 explotaciones de ganado ovino y caprino. Durante estas visitas se realizó una encuesta epidemiológica al ganadero, se evaluaron clínicamente a los animales y finalmente se procedió a la toma de muestra para realizar estudios qPCR, con la finalidad de determinar si *Anaplasma ovis* estaba presente en el rebaño.

Los resultados muestran que *Anaplasma ovis* está mucho más extendido de lo que inicialmente se pensaba. De las 47 explotaciones analizadas mediante qPCR, 44 revelaron presencia de *A. ovis*. Por el contrario, únicamente el 40,4% de las explotaciones visitadas mostraron clínica compatible con la enfermedad. Los síntomas que aparecen de manera recurrente en todas las explotaciones afectadas son: debilidad, anorexia, caquexia y epífora. El desvieje de animales jóvenes es otra característica que se repite en el 76,2% de las explotaciones afectadas.

Podemos concluir que la mera presencia de *A. ovis* en una explotación no es suficiente para explicar la aparición de la anaplasmosis clínica. No se han encontrado diferencias significativas entre los distintos grupos de explotaciones, en lo que a medidas de manejo, alimentación y protocolos sanitarios se refiere. Sin embargo, las explotaciones del norte de la comarca y los rebaños que pastan en olivares en primavera presentan un mayor riesgo de sufrir anaplasmosis clínica que los que no lo hacen, pudiendo esto estar relacionado con la presencia/ausencia del vector.

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

SUMMARY

This final project born from the need to expand existing knowledge of ovine anaplasmosis in Spain, especially in the region of Matarraña (Teruel), which is currently causing serious economic losses to farmers. The objective of this research is increase knowledge about the epidemiology

of the disease. This study is part of a series of final degree works that try to provide a comprehensive understanding of the ovine anaplasmosis.

In this study were visited 52 farms. During these visits an epidemiological survey was done to the farmers, animals were clinically evaluated and, finally, blood sampling were taken for qPCR studies, in order to determine if *Anaplasma ovis* was present in the herd.

The results show that *A. ovis* is more widespread than we initially thought. Out of the 47 farms analyzed by qPCR, 44 revealed the presence of *A. ovis*. By contrast, only 40.4% of the farms visited showed symptoms consistent with the disease. The symptoms that appear repeatedly in animals from affected farms include: weakness, anorexia, cachexia and epiphora. The culling of young animals is another feature that is repeated in 76.2% of the affected farms.

We can conclude that the mere presence of *A. ovis* in a herd is not enough to explain the outbreak of clinical anaplasmosis. There were no significant differences between groups of farms in management measures, nutrition and health protocols concerned. However, farms from the north of the region and herds grazing in olive-tree during spring suffer an increased risk of clinical anaplasmosis than those who do not. This could be explained by the presence / absence of the vector.

1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo fin de grado nace de la necesidad de ampliar los conocimientos existentes sobre la anaplasmosis ovina en España, especialmente en la comarca del Matarraña (Teruel), donde actualmente está causando graves pérdidas económicas a los ganaderos.

El objetivo principal de esta investigación es profundizar en la epidemiología de la enfermedad. Este estudio forma parte de una serie de trabajos fin de grado que pretenden proporcionar un conocimiento global sobre la anaplasmosis ovina.

Desde el año 2010 las veterinarias de la Asociación de Defensa Sanitaria (ADS) comarcal observan un cuadro clínico caracterizado por debilidad, anorexia y pérdida crónica de peso, afectando mayoritariamente a ejemplares jóvenes (1-3 años) de explotaciones ovinas semiextensivas de la comarca del Matarraña. Otros síntomas adicionales, como epifora, conjuntivitis, cojeras y abortos son esporádicamente observados. Inicialmente se relacionó con posibles causas de manejo o mala alimentación, aunque con la anamnesis del caso, rápidamente se pudo descartar esta posibilidad.

La preocupación aumenta cuando en el año 2012 el número de explotaciones afectadas comienza a incrementarse y se empieza a barajar la posibilidad de que un agente infeccioso esté involucrado. En el año 2014, 22 explotaciones de las 66 que hay en la comarca, presentan animales con esta sintomatología. Habitualmente, la morbilidad a nivel de rebaño no es alta, alrededor de 2-5 %, según el caso. Sin embargo, aumenta significativamente en los animales jóvenes, entre 1-3 años, sobre todo en las ovejas de primer parto, llegando en algunos casos a afectar al 50%, dentro de este grupo de edad. Los animales afectados tardan meses en morir, y en la mayoría de los casos, es el propio ganadero quién decide desecharlos ante la impotencia que supone el mal estado en el que quedan los animales. Según los ganaderos, la proporción de animales que consiguen recuperarse sin un tratamiento específico suele ser menor del 20%.

Ante esta preocupante situación, las veterinarias locales realizan numerosas necropsias en campo y también remiten varios animales al Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. En el estudio post mortem los únicos hallazgos relevantes son: dilatación cardiaca, aplasia medular y atrofia serosa generalizada.

Con estos indicios, la principal sospecha a nivel de campo es agalaxia contagiosa (*Mycoplasma agalactiae*), debido a la existencia de antecedentes en alguna explotación afectada y a que en algunos animales afectados se observa epifora, conjuntivitis y cojeras. Sin embargo, las serologías realizadas a nivel de campo no son suficientes para confirmar esta sospecha. Ante la insistencia de un ganadero gravemente afectado, se decide tratar con tilosina y vacunar a todo el ganado frente a agalaxia contagiosa, sin obtenerse ningún resultado satisfactorio.

En marzo de 2014 son remitidas al Servicio de Clínica de Rumiantes de la Universidad de Zaragoza (SCRUM) tres ovejas procedentes de dos explotaciones afectadas. Se trata de animales de raza Rasa Aragonesa, con edades comprendidas entre 1-3 años. Son mantenidos en cuarentena, periodo durante el cual se someten a un seguimiento clínico diario y a un gran número de pruebas diagnósticas. Los análisis clínicos son realizados en el laboratorio de Patología Médica General de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, los estudios PCR en el laboratorio privado EXOPOL y los análisis microbiológicos en el Laboratorio de Sanidad Animal del Gobierno de Aragón.

Tras las primeras exploraciones, se comprueba que los animales presentan debilidad, caquexia, ligera conjuntivitis con epífora, apetito caprichoso y picos leves de fiebre. Los análisis hematológicos y bioquímicos muestran una severa anemia de tipo normocítico y normocrómico y los enzimas AST y GGT elevados, lo cual puede ser debido a un daño hepático. Todos los intentos de detectar *Mycoplasma agalactiae* mediante PCR y cultivo microbiológico son

negativos. El único microorganismo aislado, a partir de hisopos oculares, es *Brahamella ovis*, un patógeno secundario que comúnmente produce conjuntivitis. Durante un urianálisis rutinario se encuentra como hallazgo casual en uno de los animales una orina de color oscuro y turbio, la cual reveló bilirrubinuria, hemoglobinuria y proteinuria.

Estos resultados ayudan a reorientar el diagnóstico hacia el cuadro de anemia hemolítica detectado. Debido a la distribución epidemiológica de la enfermedad y al gran número de explotaciones afectadas, se descartan, en un primer momento, posibles causas hemolíticas de origen nutricional y se centran los esfuerzos en encontrar un microorganismo con carácter infectocontagioso. Puesto que en todas las necropsias realizadas no ha sido detectada ninguna lesión, la principal sospecha es una agente intracelular hemático, siendo los más frecuentes en nuestras latitudes los piroplasmas (*Babesia sp* y *Theileira sp*), y *Anaplasma sp* (Alessandra and Santo, 2012; De La Fuente et al., 2004a).

Por ello, en primer lugar, se realiza una extensión de sangre teñida mediante la técnica de panóptico rápido, detectándose pequeñas formas redondeadas basófilas dentro de los eritrocitos, compatibles con patógenos intraeritrocitarios, lo que conduce a realizar una PCR para detectar *Anaplasma sp* y Piroplasmas resultando positiva a *Anaplasma sp*. Una PCR posterior certifica que la especie es ***Anaplasma ovis***, principal agente causal de la anaplasmosis ovina (Alessandra and Santo, 2012).

1.1 Género *Anaplasma*

El género ***Anaplasma*** está formado por bacterias Gram negativas intracelulares obligadas, las cuales se multiplican en el interior de las células sanguíneas de los mamíferos (Rymaszewska and Grenda, 2008). Todas la especies del Gº *Anaplasma* tienen en común que son transmitidas por garrapatas, siendo este invertebrado el vector biológico de la enfermedad, ya que la bacteria es capaz de multiplicarse en ciertas células del mismo (Kocan et al. 2010; Brayton 2012). Este género, junto con *Ehrlichia*, *Neorickettsia* y *Wolbachia*, conforman la familia *Anaplasmataceae*, perteneciente al orden de los *Rickettsiales* (Dumler et al., 2001).

Actualmente se conocen 6 especies diferentes dentro del Gº *Anaplasma*, entre las que hay diferencias destacables respecto a las especies de mamíferos que afectan, células sanguíneas en las que se multiplican y vectores biológicos más eficaces (Rymaszewska and Grenda, 2008). Algunas de estas especies de anaplasma fueron renombradas recientemente, ya que surgieron tras una profunda reorganización del Orden *Rickettsiales* en 2001, en base a la secuenciación de los genes *16S rDNA* y *groESL* (Dumler et al., 2001).

Estudios sobre la anaplasmosis ovina en la comarca del Matarraña (Teruel)
Estudio epidemiológico

Antes de 2001	Después de 2001	Enfermedad	Vector	Hospedador	Células infectadas
<i>Ehrlichia bovis</i>	<i>Anaplasma bovis</i>	Anaplasmosis bovina	<i>Haemaphysalis sp.</i> <i>Rhipicephalus sp.</i> <i>Amblyomma sp.</i>	Rumiantes Pequeños mamíferos	Monocitos
<i>Anaplasma ovis</i>	<i>Anaplasma ovis</i>	Anaplasmosis ovina	<i>Dermacentro sp.</i> <i>Rhipicephalus sp.</i>	Pequeños rumiantes	Eritrocitos
<i>Anaplasma marginale</i>	<i>Anaplasma marginale</i>	Anaplasmosis bovina	<i>Ixodes sp.</i> <i>Dermacentor sp.</i>	Rumiantes	Eritrocitos
<i>Anaplasma centrale</i>	<i>Anaplasma centrale</i>	Anaplasmosis bovina	<i>Ixodes sp.</i> <i>Haemaphysalis sp.</i>	Rumiantes	Eritrocitos
<i>Ehrlichia equi</i> <i>E. phagocytophila</i> <i>Czynniki HGE</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Anaplasmosis granulocítica humana y animal	<i>Ixodes sp.</i> <i>Dermacentor sp.</i>	Pequeños rumiantes, caballos, perros y humanos	Leucocitos polimorfonucleares o "granulocitos"
<i>Ehrlichia platys</i>	<i>Anaplasma platys</i>	Trombocitopenia cíclica canina	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Perros	Plaquetas

Tabla 1. Especies del G^o *Anaplasma* y sus características (Rymaszewska and Grenda, 2008).

La primera descripción de este género bacteriano fue realizada por Sir Arnold Theiler, quien observó mediante microscopía óptica unos "puntos marginales" en los eritrocitos de ganado vacuno enfermo, en Sudáfrica (Kocan et al., 2010). En los últimos años el interés por este género de bacterias se está incrementando, especialmente en las especies *A. marginale*, *A. phagocytophilum* y *A. ovis* (Rymaszewska and Grenda, 2008). Actualmente, la anaplasmosis es la enfermedad bacteriana transmitida por garrapatas más común entre los ungulados domésticos y salvajes de Europa (Dumler et al., 2001) y una de las enfermedades que más condiciona la producción ganadera en numerosos países (Kocan et al., 2010).

A. marginale infecta los eritrocitos de los rumiantes domésticos y salvajes, causando la anaplasmosis bovina. Esta enfermedad está extendida en áreas tropicales y subtropicales de todo el mundo, siendo uno de los mayores condicionantes para la producción bovina en estas áreas (Kocan et al. 2010). En EEUU se calcula que esta enfermedad esté causando unas pérdidas anuales de 300 millones de dólares (Corona Rodríguez, and Martínez 2004). En América Latina es común encontrar infecciones mixtas de *A. marginale*, *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. Este cuadro, denominado "tristeza parasitaria bovina" (Carriquiry, 2010), es uno de los principales motivos por el que las razas bovinas europeas no son viables en sistemas extensivos de zonas tropicales.

A. phagocytophilum, antiguamente conocida como *Ehrlichia phagocytophila* y *Ehrlichia equi*, infecta los leucocitos polimorfonucleares causando la anaplasmosis granulocítica humana y la fiebre transmitida por garrapatas (*tick-borne fever*) en los rumiantes (Brouqui et al., 2004). A diferencia del resto de especies, *A. phagocytophilum* es transmitida específicamente por el género de garrapatas *Ixodes*, propio del hemisferio norte y de climas oceánicos. Por ello esta es la especie más común e importante en Europa (Woldehiwet, 2010).

A. ovis infecta a los eritrocitos de los pequeños rumiantes, siendo el principal agente causante de la anaplasmosis ovina (Alessandra and Santo, 2012). Al igual que *A. marginale*, esta bacteria produce anemia hemolítica en los animales infectados (Yasini et al. 2012; Ciani et al. 2013). Un único caso ha sido descrito de *A. ovis* como agente causal de anaplasmosis humana, en Chipre (D. Chochlakis 2010).

A. ovis es la especie de anaplasma menos estudiada, ya que afecta a especies de bajo valor económico, como son los pequeños rumiantes, que sin embargo, son vitales para la supervivencia de muchas comunidades desfavorecidas, propias de regiones tropicales y subtropicales, donde la enfermedad es más común (Rymaszewska and Grenda, 2008). Se sabe que esta enfermedad está ampliamente distribuida (Renneker et al., 2013b) pero, sin embargo, no hay ningún estudio que cuantifique las pérdidas económicas que pueda estar ocasionando..

1.2 *Anaplasma ovis*: patogenia, signos clínicos y diagnóstico

Esta bacteria penetra por invaginación al eritrocito 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 pasarán a infectar nuevos eritrocitos (Corona. B, 2004).

La grave anemia hemolítica que se produce tras la infección es consecuencia de la respuesta inmune celular, no hay evidencias de hemólisis intravascular causada directamente por la bacteria (Bautista G., 1996). Por un lado, la anemia es debida a la fagocitosis de los eritrocitos infectados por parte de los macrófagos del bazo, y en segundo lugar, por una destrucción inmunomediada, tanto de eritrocitos infectados como no infectados, en la que intervienen los linfocitos B que por medio de inmunoglobulinas de membrana, llevan a cabo una opsonización extravascular de los eritrocitos, contribuyendo así a la fagocitosis (Bautista G., 1996; Yasini et al., 2012). Es habitual que estos patógenos intraeritrocitarios generen una respuesta autoinmune, debido a la producción de anticuerpos anti-eritrocitos, que el sistema humoral produce ante la alteración de la membrana de los eritrocitos afectados (Bautista G., 1996).

Los animales infectados por *A. ovis* sufren un pico de bacteriemia aguda alrededor de la segunda semana post-infección (Yasini et al., 2012). El período prepatente es de dos a tres semanas post-infección (Corona. B, 2004). Los síntomas que aparecen tras este periodo son fiebre, debilidad, anorexia, anemia progresiva y finalmente, pérdida de peso (Ciani et al., 2013; Yasini et al., 2012). Todos estos síntomas afectan directamente a la producción del animal, la cual se ve seriamente comprometida (Rymaszewska and Grenda, 2008).

Otros síntomas como la hemoglobinuria han sido descritos (Hornok et al., 2007), pero no son habituales. Ictericia no ha sido descrita en la anaplasmosis ovina, pero si en bovinos infectados con *A. marginale* (Corona. B, 2004; Kocan et al., 2010).

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 hematocrito (Ciani et al., 2013).

Tras la fase aguda, lo habitual es que el animal se recupere clínicamente sin llegar a eliminar por completo la bacteria. Esta queda latente en el hospedador, convirtiéndose en portador subclínico (Bautista G., 1996). El rebrote de la enfermedad es posible, sobre todo si se ve favorecido por cambios fisiológicos o factores estresantes, causando así una insidiosa pérdida de producción en las explotaciones afectadas (Alessandra and Santo, 2012). Los animales portadores subclínicos son fundamentales para perpetuar el ciclo del patógeno en un ecosistema, ya que son los principales reservorios a partir de los cuales las garrapatas captarán la bacteria al alimentarse. Identificar los portadores asintomáticos es el mayor reto que presenta el control de esta enfermedad a la hora de mover animales de zonas endémicas a zonas libres de la enfermedad.

La gravedad de los síntomas parece que depende de varios factores, 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. B, 2004; Torina et al., 2010), pudiendo llegar en casos puntuales, a terminar con la vida del animal (Ciani et al., 2013). Además, la gravedad de la enfermedad se ve aumentada cuando se presenta junto a otros agentes patógenos en infecciones mixtas (Alessandra and Santo, 2012).

En ovino se ha demostrado la influencia de la raza en la gravedad de los síntomas de la anaplasmosis y de otras enfermedades transmitidas por garrapatas (Ciani et al., 2013; Hurtado et al., 2015; Pieragostini et al., 2011). Las razas originarias de áreas con una alta prevalencia de este tipo de enfermedades han sido sometidas a una intensa presión de selección durante siglos. Generación tras generación estas razas se han hecho más resistentes a estas enfermedades. Estos animales se infectan y sufren la enfermedad igualmente, pero los síntomas son menos graves y su capacidad de recuperación es mucho mayor (Pieragostini et al., 2011).

Un ejemplo de esto se da en el norte de España, donde hay gran abundancia de garrapatas y la babesiosis y anaplasmosis son endémicas. Las razas autóctonas, como la Latxa, no suelen presentar brotes clínicos de estas enfermedades. Sin embargo cuando se han introducido razas extranjeras, como la raza Assaf, las mortalidades han sido muy altas (Hurtado et al., 2015).

El diagnóstico clínico de esta enfermedad es complicado, debido a la ausencia de lesiones características y a la inespecificidad del cuadro clínico. Lo habitual es que los síntomas de esta enfermedad no se relacionen con una patología concreta (Hornok et al. 2007; Alessandra and Santo 2012). Sin embargo, en zonas donde hay antecedentes de anaplasmosis ya diagnosticados, el diagnóstico clínico es posible, siendo siempre conveniente confirmar con un análisis laboratorial (Kocan et al., 2010).

Antiguamente el diagnóstico se realizaba mediante microscopía óptica, observando inclusiones en eritrocitos de extensiones de sangre periférica teñidas con colorante Giemsa (Oie, 2012). Sin embargo, esta prueba ha quedado obsoleta debido a su baja sensibilidad y especificidad. En realidad, esta prueba solo es capaz de detectar la bacteria en el periodo donde el porcentaje de eritrocitos infectados es mayor de 0,1-0,2 % (Corona. B, 2004) y esto se da en un corto periodo de tiempo, entre la semana 2-6 post-infección. Por ello, esta prueba solo es útil para diagnosticar un brote agudo, pero es inservible para diagnosticar animales crónicos o subclínicos (Oie, 2012). A pesar del bajo coste de esta prueba, se necesita una gran experiencia para poder dar un diagnóstico fiable, y en ningún caso se puede identificar la especie de anaplasma.

Las técnicas de diagnóstico molecular, como la PCR, han mejorado considerablemente las posibilidades de diagnóstico directo, gracias a su gran sensibilidad y especificidad. Permiten detectar bajas concentraciones de bacteria y además, permite identificar con gran seguridad la especie de anaplasma. Además, estas modernas técnicas permiten detectar la presencia de patógenos en los vectores con relativa facilidad (Shkap et al., 2009). Por ello, estas pruebas son una herramienta fundamental a la hora de realizar estudios fiables sobre epidemiología, tratamientos y diagnóstico.

Sin embargo, actualmente, las pruebas más utilizadas en el diagnóstico rutinario de la enfermedad son las pruebas serológicas, especialmente en el ganado bovino (Kocan et al., 2010). Estas son pruebas indirectas, ya que miden la reacción del hospedador frente al patógeno y no al patógeno en sí. Dentro de este grupo, la más utilizada y la más fiable es el ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Kocan et al., 2010), pero también hay otras como CAT (Card-agglutination test) que tienen una menor fiabilidad, pero que se pueden realizar en condiciones de campo (Oie, 2012).

Estas pruebas, especialmente el ELISA, presentan ciertas ventajas frente al resto de técnicas. Por ejemplo, permiten analizar un gran número de muestras en poco tiempo y detectan animales que han sufrido la enfermedad en el pasado, pero que en el momento del análisis presentan una carga bacteriana muy baja en sangre, la cual no es detectable por técnicas directas como la PCR

(De La Fuente et al., 2005). Esta situación puede darse en animales que han sido tratados o en portadores subclínicos. Sin embargo, el principal inconveniente de esta prueba son las reacciones cruzadas que presenta entre las distintas especies de anaplasma, lo cual puede dar lugar a falsos positivos (Oie, 2012), no siendo además, esta prueba válida para diagnosticar animales durante las primeras semanas de infección.

1.3 Ciclo epidemiológico

Como ha sido explicado anteriormente, este género de bacterias intracelulares obligadas necesitan un vector para poder transmitirse a nuevos hospedadores. En el caso de la anaplasmosis el vector principal son las garrapatas, las cuales juegan un papel imprescindible para que la bacteria pueda infectar a nuevos hospedadores (Rymaszewska and Grenda, 2008). *A. ovis* es transmitido biológicamente por las especies de garrapatas *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus turanicus*, *Dermacentor silvarum*, *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor andersoni* y *Haemaphysalis sulcata* (Alessandra and Santo, 2012).

Cuando la garrapata se alimenta de un animal infectado, la bacteria pasa a infectar las células intestinales. Posteriormente, la bacteria pasa a colonizar las células de las glándulas salivares donde se dividirá por fisión binaria (Brayton, 2012; Kocan, 1995; Shkap et al., 2009). Las bacterias se transmiten intraestadialmente y transestadialmente dentro de la garrapata, por lo que ésta permanecerá infectiva a lo largo de todo su ciclo vital (Oie, 2012). Sin embargo, la transmisión transovárica no ha sido descrita (Shkap et al., 2009).

Esto es realmente importante para entender la importancia de los machos de garrapata, ya que durante su labor reproductiva se alimentan de multitud de hospedadores y su vida media es considerablemente mayor que la de las hembras. Por ello, en algunos ecosistemas tropicales donde no hay inviernos muy fríos, los machos de garrapata se comportan como auténticos reservorios de la enfermedad (Kocan, 1995; Oie, 2012).

Hay otros vectores, en este caso mecánicos, que también pueden llegar a ser importantes. Un vector mecánico puede ser cualquier objeto que entre en contacto con la sangre, como agujas o material quirúrgico, pero también pueden ser insectos hematófagos, como el tábano, *Tabanus sp.* (Hornok et al., 2008) o la mosca de los establos, *Stomoxys calcitrans* (Scoles et al., 2005). Estos vectores pueden ser más importantes de lo que se cree, ya que se han encontrado cepas de *Anaplasma marginale* que no pueden ser transmitidas por garrapatas (Brayton, 2012) o localizaciones donde no hay garrapatas y anaplasma está circulando. También es importante recalcar la importancia de la higiene en los tratamientos colectivos de productos que se administran vía intramuscular, ya que aunque la aguja no esté visiblemente manchada con

sangre, la transmisión es posible, como ya se ha demostrado en el ganado bovino (Reinbold et al., 2010).

La garrapata se considera un vector biológico más eficaz porque *Anaplasma sp.* es capaz de infectar y replicarse en las células de este invertebrado. Sin embargo, los vectores mecánicos introducen directamente los eritrocitos infectados en el hospedador, sin que haya multiplicación previa del patógeno, por ello son mucho menos efectivos que los vectores biológicos (Scoles et al., 2005).

Otra vía relevante de transmisión es la vertical o materno-fetal. Esta posibilidad se ha observado en bovinos infectados con ciertas cepas de *Anaplasma marginale* (Grau et al., 2013; Silvestre et al., 2015) y en ovinos infectados experimentalmente por *Anaplasma phagocytophilum* (Reppert et al., 2013). Con *A. ovis* no se ha demostrado esta vía de transmisión, sin embargo, visto el parecido filogenético de estas especies, se debería tener en cuenta y estudiar en futuras investigaciones.

El conocimiento sobre el vector es fundamental para entender la epidemiología de la anaplasmosis y conocer los riesgos existentes (Torina et al., 2008). Normalmente, las altas prevalencias de *A. ovis* se producen en áreas donde el ambiente y los factores climáticos son propicios para el desarrollo de las especies de garrapatas transmisoras (Alessandra and Santo, 2012).

Hay una gran variedad de factores que pueden afectar a las poblaciones de garrapatas transmisoras de estas enfermedades. El clima, el suelo, el tipo de vegetación, la humedad, el ecosistema animal y el manejo de las especies ganaderas, influyen directa o indirectamente en las distribuciones de las distintas especies de garrapatas (Torina et al., 2008).

Por otro lado, algunos autores han demostrado la importancia que pueden tener los rumiantes salvajes como reservorios y propagadores de la enfermedad (Berggoetz et al., 2014; Ciliberti et al., 2015; de la Fuente et al., 2008; De La Fuente et al., 2004a, 2004b), sobre todo en ecosistemas donde comparten áreas de pastoreo con las especies domésticas. En nuestro país, y especialmente en la comarca del Matarraña, estas condiciones son idóneas debido a las altas poblaciones de cabra ibérica (*Capra pirenaica hispanica*) y corzo (*Capreolus capreolus*) que existen actualmente (Benavente Serrano and Thomson Listerra, 2003).

La estabilidad enzoótica o equilibrio endémico de esta enfermedad se da en los climas cálidos donde las garrapatas son abundantes durante todo el año. Esto implica la presencia de un alto porcentaje de ganado infectado, con la rara ocurrencia de la enfermedad clínica (Corona. B, 2004).

Esta relación se mantiene debido a dos factores: la inmunidad pasiva proveída por el calostro y la temprana infección de los animales. Durante los primeros meses de edad los animales adquieren la infección sin presentar los signos aparentes de la enfermedad y la inmunidad resultante tras la primoinfección es mantenida en el ganado adulto mediante reinfecciones, sin aparición de síntomas clínicos (Corona. B, 2004).

Si los animales no se infectan en los primeros meses de vida, se romperá este equilibrio porque habrá un grupo de animales sin inmunizar que cuando se infecten por primera vez sufrirán la enfermedad clínica, ya que la protección calostrada ya no será efectiva. Esta situación se denomina **inestabilidad enzoótica** y se puede producir por una ausencia de garrapatas prolongada durante un largo periodo de tiempo o por la introducción de animales adultos provenientes de zonas libres de la enfermedad en zonas endémicas.

En el clima mediterráneo español las condiciones meteorológicas favorables para las garrapatas son estacionales. Esto da lugar a largos periodos durante los cuales los animales no están en contacto con el vector, por lo que la inestabilidad enzoótica es común en este ecosistema. Además, esto se ve favorecido por los sistemas productivos semiextensivos, donde raramente las corderas de reposición se crían con sus madres en el pasto. Lo habitual es que estas corderas se críen estabuladas hasta la edad de 4 meses, cuando empiezan a salir con el ganado adulto. Este hecho, unido a la estacionalidad del vector, aumenta en gran medida el riesgo de que el animal se infecte por primera vez cuando la inmunidad calostrada ya no es efectiva, por lo que la probabilidad de aparición de enfermedad clínica aumenta.

1.4 Distribución mundial

La anaplasmosis ovina es endémica de zonas tropicales y subtropicales donde está ampliamente distribuida, pero también se da con frecuencia en zonas de clima templado y especialmente en la cuenca mediterránea (Torina et al., 2008) y oriente medio (Renneker et al., 2013b), pero es de esperar que debido al cambio climático se puedan dar en otros ecosistemas (Jonsson and Reid, 2000).

A. ovis ha sido diagnosticado en Colombia (Pulgarín et al., 2013), Senegal (Djiba et al., 2013), Sudáfrica (Berggoetz et al., 2014), Sudán (Renneker et al., 2013b), Irak (Renneker et al., 2013a) Eslovaquia (Víchová et al., 2014), República Checa (Derdáková et al., 2011), Hungría (Hornok et al., 2007) y, por supuesto, también en países mediterráneos con ecosistemas muy parecidos al nuestro. En Italia, hasta un 82,9% de las muestras analizadas mediante serología eran positivas (Alessandra and Santo, 2012), en Portugal, el 82,9% de las muestras analizadas mediante PCR fueron positivas (Renneker et al., 2013b). En el norte de Túnez, el 91,1% de las muestras

analizadas mediante PCR fueron positivas (Belkahia et al., 2014) y en Grecia, un 35,9 % de las muestras analizadas mediante serología también fueron positivas (Giadinis et al., 2015).

En España, *A. ovis* se ha diagnosticado en corzo (*Capreolus capreolus*) en Andalucía, con una prevalencia del 82% de los animales muestreados mediante PCR (de la Fuente et al., 2008) y en el País Vasco un 36,6% de las ovejas adultas analizadas mediante PCR fueron positivas (Barandika, 2013).

Todos estos estudios recientes revelan que *A. ovis* está mucho más extendido de lo que se pensaba, llegando a alcanzar prevalencias muy altas en ambientes propicios para su vector (Renneker et al., 2013b). Llama poderosamente la atención que a pesar de las altas prevalencias en algunas zonas, apenas haya bibliografía sobre brotes clínicos de anaplasmosis ovina. Esto puede ser debido al difícil diagnóstico clínico de esta enfermedad, que le permite pasar desapercibida a pesar de estar causando pérdidas productivas, o bien que en estas regiones se haya alcanzado un equilibrio endémico y mientras éste no se rompa, por una variación de las poblaciones de vectores o por la introducción de animales nacidos en áreas libres de la enfermedad, no aparecerá la sintomatología clínica.

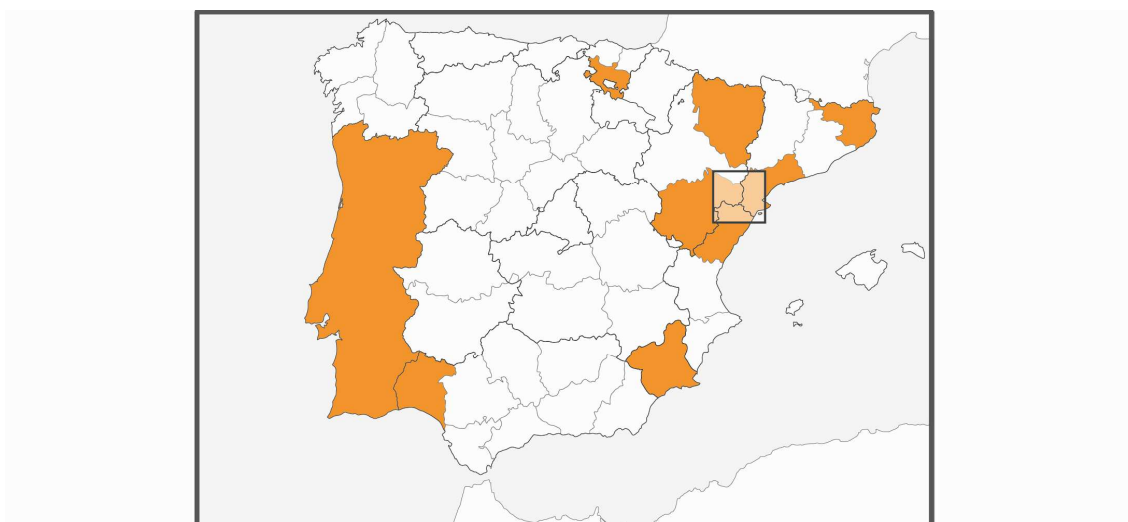


Figura 1: Provincias de la península donde se ha diagnosticado *A. ovis*, coloreadas de naranja. Fuente: laboratorio EXOPOL, (Renneker et al., 2013b), (Barandika, 2013).

Por otro lado, parece que la distribución de la enfermedad en nuevas poblaciones susceptibles se está produciendo a gran velocidad y esto, probablemente, sea debido a como el cambio climático está afectando a la distribución de las poblaciones de vectores (Jonsson and Reid, 2000). Otros factores como la deforestación, el incremento de las poblaciones de rumiantes silvestres, la creciente movilidad de animales domésticos y la vuelta a sistemas tradicionales de producción, están favoreciendo el contacto entre hospedador y vector, produciéndose así la

enfermedad en áreas donde tradicionalmente se desconocía (Wielinga et al., 2006). Se podría decir que en muchas zonas templadas del hemisferio norte, la anaplasmosis ovina podría considerarse una enfermedad emergente.

1.5 Investigaciones previas

Tras el diagnóstico inicial de *A. ovis* como agente causal del cuadro observado en la comarca del Matarraña se abrieron multitud de interrogantes. En la bibliografía no hay ningún caso descrito de un brote de anaplasmosis ovina tan grave, por ello se hizo necesario investigar el tema en mayor profundidad para poder corroborar nuestro diagnóstico y aportar soluciones a las granjas afectadas.

El primer punto abordado fue el tratamiento, debido a la urgencia por encontrar una solución para los ganaderos. Este tema ha sido desarrollado en profundidad por mi compañera Teresa Fanlo Escudero en otro trabajo fin de grado perteneciente a este grupo de estudios sobre la anaplasmosis ovina. El tratamiento con doxiciclina intra muscular durante 7 días resultó ser el tratamiento más eficaz.

Otro trabajo fue realizado paralelamente realizando una infección experimental en tres corderas libres de la enfermedad a partir de sangre de animales infectados por *A. ovis* y con sintomatología representativa. Esta investigación fue llevada a cabo por el compañero José Calasanz Jimenez Gracia. Los animales infectados reprodujeron la sintomatología, en especial el cuadro de anemia grave.

Además de todo ello, la epidemiología de esta enfermedad y su distribución en la comarca era un aspecto muy importante en que debíamos indagar. Para ello realizamos un primer muestreo en la zona afectada en mayo de 2014. Se visitaron 6 explotaciones afectadas, 3 de la comarca del Matarraña y 3 de pueblos colindantes de Cataluña. En todas las explotaciones fueron recogidas muestras de sangre de ovejas con sintomatología y sin sintomatología y se recolectan garrapatas de las ovejas, perros de ganado, perros de guarda y del medio ambiente, capturadas mediante manto aleatorio en zonas colindantes a las explotaciones.

Los resultados mostraron que *A. ovis* está ampliamente difundido en todos los animales, tanto sanos como enfermos de las explotaciones afectada. Todas las garrapatas capturadas resultaron ser *Rhipicephalus turanicus*. 23 garrapatas fueron enviadas al Instituto Nacional de Investigación de Recursos Cinegéticos (IREA) donde se realizaron análisis PCR a partir de las glándulas salivares de los artrópodos. Todas ellas demostraron presencia *A. ovis* en sus glándulas salivares, incluso las capturadas directamente del ambiente mediante manto, lo que indica que posiblemente

esta especie de vector esté involucrada en la transmisión de la bacteria. Otros autores han relacionado *Rhipicephalus turanicus* con la transmisión de *A. ovis*, concretamente en Sicilia (Alessandra and Santo, 2012) y en Túnez (Belkahia et al., 2014). En el IREA también se analizaron 49 muestras de cabra montés (*Capra pirenaica hispanica*) procedentes de la zona afectada mediante PCR, siendo 19 de ellas positivas frente *A. ovis*. Diversos autores han señalado el importante papel que juegan las especies silvestres como reservorios y propagadores de las enfermedades transmitidas por vectores (Berggoetz et al., 2014; Ciliberti et al., 2015; de la Fuente et al., 2008; De La Fuente et al., 2004a, 2004b). En la comarca del Matarraña estos rumiantes salvajes son muy abundantes por lo que es probable que formen parte del ciclo epidemiológico de la enfermedad.

Finalmente, en julio de 2014 se tomaron muestras de sangre de 10 corderas nacidas durante el invierno anterior en explotaciones con presencia de la enfermedad. Todas las muestras fueron positivas mediante PCR frente a *Anaplasma sp.* Estos resultados muestran la difusión de la bacteria durante la primavera, probablemente debido a la abundancia de vectores potenciales durante esta estación. Esto hace pensar que sea probablemente ésta la época de mayor riesgo.

2. OBJETIVOS

Vista la complejidad y amplitud del problema se decide realizar un estudio epidemiológico amplio que englobe explotaciones de todos los municipios de la comarca, tengan clínica compatible o no. Además, se plantea la realización de una encuesta epidemiológica en la que se pregunte a los ganaderos sobre varios aspectos de manejo, alimentación, protocolos sanitarios y patología.

La finalidad de todo ello es conocer la importancia real de *A. ovis* sobre el estado sanitario de los rebaños y averiguar qué factores favorecen la aparición de la enfermedad estudiada, para finalmente poder obtener una serie de recomendaciones realistas que puedan ser útiles para los veterinarios y ganaderos.

Para conseguirlo se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Conocer el número de rebaños que tienen animales infectados por *A. ovis*.
- Valorar las diferencias entre rebaños donde *A. ovis* está presente y en los que no.
- Averiguar en qué medida la presencia de *A. ovis* en un rebaño influye en el estado sanitario del mismo.
- Valorar las diferencias entre explotaciones con y sin sintomatología.

- Determinar qué factores no relacionados con el agente etiológico, tales como factores climáticos o zootécnicos, puedan estar favoreciendo la presencia de enfermedad.
- Caracterizar clínicamente el cuadro estudiado.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Visita a las explotaciones, encuesta epidemiológica y toma de muestras para análisis qPCR

Desde marzo hasta noviembre de 2015 han sido visitadas 50 explotaciones de ovino y 2 de caprino a lo largo de todos los municipios de la comarca del Matarraña, Teruel.

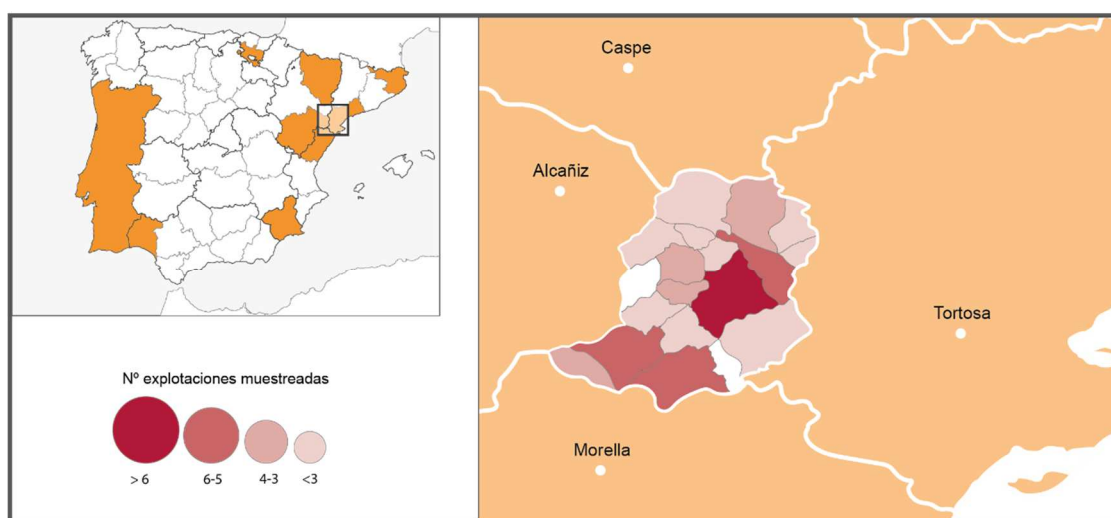


Figura 2: Municipios de la comarca del Matarraña y número de explotaciones muestreadas.

Durante estas visitas se realiza una encuesta epidemiológica a los ganaderos con el fin de obtener aquella información relevante para nuestro estudio. Estos son preguntados sobre aspectos relativos a censos, manejo reproductivo, zonas de pastoreo, alimentación, limpieza, tratamientos sanitarios, procesos patológicos sufridos, observación de sintomatología compatible con el cuadro estudiado, tratamientos antibióticos realizados y observación de vectores.

Tras la realización de la encuesta se recogen muestras de sangre entera para la realización de diversas pruebas diagnósticas laboratoriales. Para ello se extrae sangre de la vena yugular con tubos tipo “vacutainer” con anticoagulante EDTA. Estas muestras son refrigeradas a 4°C, durante un máximo de tres días, hasta que son procesadas en el laboratorio de Patología Médica de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, donde se realizarán los análisis clínicos. Posteriormente, estas muestras se distribuyen en tubos eppendorf de 1,5ml, etiquetados individualmente y que

son congelados a -20°C, a la espera de ser enviados al laboratorio externo EXOPOL, diagnóstico y autovacunas, donde se realizará el análisis mediante qPCR (quantitative-real time PCR) para detectar *Anaplasma ovis*.

El objetivo de los muestreos no es conocer el porcentaje de animales infectados en el rebaño, sino únicamente conocer si la bacteria está presente. De esta manera es posible reducir el tamaño de muestreo. Además, las muestras de una misma explotación se agrupan en conjuntos de 5 muestras, denominadas “pools”. De esta manera un único análisis qPCR proporciona información conjunta de 5 animales.

Inicialmente, el tamaño del muestreo, depende del tamaño del rebaño y de la situación sanitaria en relación al cuadro clínico estudiado. En base a los estudios previos realizados durante el año 2014 se estima que la prevalencia individual varía de acuerdo a dos aspectos fundamentalmente:

- Presencia/ausencia de animales con sintomatología clínica compatible en el rebaño.
- Uso de tratamientos antibióticos de manera generalizada a nivel de rebaño.

Gracias a la encuesta epidemiológica y a las observaciones clínicas in situ se clasifican las explotaciones en tres categorías:

- Tipo I: explotaciones sin síntomas compatibles. El ganadero no reconoce los síntomas cuando es preguntado, no ha realizado un desvieje de animales jóvenes y la veterinaria de explotación no ha tenido ninguna notificación de patología compatible en los últimos 5 años.

En este tipo de explotaciones se realiza un muestreo aleatorio entre los animales presentes menores de 5 años de edad. Para que el rebaño sea considerado negativo a la presencia de *A. ovis* se decide asumir como rebaño libre aquel que presente una prevalencia menor al 10%. Para el cálculo del número de animales a muestrear por rebaño se asume un 95% de intervalo de confianza.

Tamaño del rebaño	% de muestreo	n (media)
< 300	10,80%	27
301-600	5,60%	28
601-900	3,73%	28
>900	2,90%	29

Tabla 2: tamaño de muestreo realizado en las explotaciones de Tipo I.

- **Tipo II:** explotaciones con síntomas compatibles y sin tratamiento específico instaurado. El ganadero sí que reconoce los síntomas cuando es preguntado, ha habido desvío de animales jóvenes y la veterinaria de explotación confirma que ha sido notificada de la existencia de una patología compatible, pero que no se ha prescrito ningún tratamiento. En este tipo de explotaciones cabe esperar una prevalencia muy alta de *A. ovis*. El muestreo de animales es dirigido a aquellos que presentan o han presentado signos clínicos compatibles con la infección por *A. ovis*. En este tipo de explotaciones los estudios previos han permitido conocer que la prevalencia esperada, detectada mediante PCR de “pools” de 5 muestras, es mayor del 90%. Además, por convenio, en estos rebaños con síntomas compatibles, la simple detección de la infección en un animal se considera evidencia suficiente de infección en el rebaño. Esto permite reducir considerablemente el tamaño de muestreo. Igualmente, se asume un 95% de intervalo de confianza para el cálculo del tamaño de muestreo.

Tamaño del rebaño	% de muestreo	n (media)
< 300	1,60%	4
301-600	0,90%	4
601-900	0,60%	5
>900	0,50%	5

Tabla 3: tamaño de muestreo realizado en las explotaciones de Tipo II.

- **Tipo III:** explotaciones con síntomas compatibles, pero que sí han instaurado tratamiento antibiótico. A diferencia del caso anterior la prevalencia detectada en estudios anteriores en este tipo de explotaciones ha sido menor, posiblemente debido a la acción antibiótica. Dado que existe una elevada probabilidad de que la enfermedad esté presente en el rebaño se decide considerar rebaño libre de *A. ovis* aquel que presente una prevalencia menor al 20%. La población diana del muestreo son todos los animales presentes menores de 5 años, dado que el tratamiento recibido puede estar enmascarando los signos clínicos impidiendo la elección de animales enfermos. Asumiendo un 95% de intervalo de confianza el tamaño de muestreo es el siguiente:

Tamaño del rebaño	% de muestreo	n (media)
< 300	5,60%	14
301-600	2,80%	13
601-900	1,87%	14
>900	1,40%	14

Tabla 4: tamaño de muestreo realizado en las explotaciones de Tipo II.

Las muestras tomadas en cada explotación son agrupadas en “pools” de cinco muestras y analizadas mediante qPCR. Cada análisis, por lo tanto, es realizado sobre un conjunto de cinco muestras puesto que la elevada sensibilidad de la prueba diagnóstica lo permite. Esto propicia un ahorro importante para el desarrollo del estudio. Como contrapartida se pierden la información de prevalencia individual.

Al agrupar las muestras se produce un ajuste del número de muestras a tomar de acuerdo a la clasificación de cada explotación, resultando finalmente el tamaño de muestreo de la siguiente manera:

Estatus sanitario	Nº de animales a muestrear	Nº de pooles	Nº de PCR realizadas
Tipo I (sin síntomas)	30	6	6
Tipo II (con síntomas)	5	1	1
Tipo III (con síntomas y con tratamiento)	15	3	3

Tabla 5: tamaño de muestreo realmente realizado en las explotaciones.

3.2 Análisis qPCR

Quantitative-real time PCR Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) es una técnica de diagnóstico molecular similar a la PCR clásica, pero que es capaz de cuantificar a tiempo real el producto resultante de la amplificación. Al comparar la curva de amplificación de la muestra problema con la curva de amplificación estándar de una muestra de concentración conocida es posible calcular el número de copias de ADN iniciales presentes en la muestra problema. Esto es lo que permite a este tipo de PCR ser realmente cuantitativa.

En total se han realizado 111 qPCR a partir de los pooles de 555 muestras provenientes de 47 explotaciones de toda la comarca. Sin embargo, se tomaron 940 muestras de sangre, pero en la mayoría de explotaciones de Tipo I no fue necesario analizar las 30 muestras recolectadas para certificar la presencia de *A. ovis* en la explotación, ya que, como solo queríamos certificar la

presencia de la bacteria en la explotación y con el fin de ahorrar costes, si salía el primer pool positivo, ya no se analizaban el resto.

Tipo de explotación.	Número de explotaciones.	Número de muestras
Tipo I	25	750
Tipo II	14	70
Tipo III	8	120

Tabla 6: número de muestras tomadas en cada tipo de explotación. .

Cada “pool” a partir del cual se realiza la extracción de ADN para realizar la qPCR está formado por 1,25 ml de sangre proveniente de 5 muestras individuales a partes iguales (5 x 250 µl). Finalmente, de este “pool” se utilizarán únicamente 250 µl para la extracción. La extracción de ADN se realiza con un equipo de extracción automática de ácidos nucleicos “LABTURBO 48C” de la casa TAIGEN Co. utilizando el kit comercial Labturbo DNA Mini kit 480 de la misma compañía.

Este ensayo de qPCR tiene como diana el *gen msp4* (major surface protein 4), específico de *Anaplasma ovis*. Este marcador es el más comúnmente utilizado por los investigadores para detectar *A. ovis* (Alessandra and Santo, 2012; Belkahia et al., 2014; Derdáková et al., 2011; Renneker et al., 2013b; Torina et al., 2010, 2008).

El límite inferior de cuantificación de la prueba es de 50 copias/reacción. Además, el ensayo lleva incluido un control endógeno válido para cualquier muestra de rumiante. Como control positivo se utiliza un oligonucleótido sintético del gen diana, que incluye los sitios de unión de las sondas de amplificación del ensayo. Este control positivo está cuantificado en 5×10^6 copias/reacción.

3.3 Análisis clínicos

En total se han realizado 52 hematologías de animales con clínica representativa. Todas ellas han sido realizadas en el laboratorio de Análisis de la Unidad de Patología General y Médica. Para ello se ha utilizado un contador hematológico automático scil Vet abc y fueron analizados los siguientes parámetros: leucocitos totales, eritrocitos, concentración de hemoglobina, plaquetas, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración hemoglobina corpuscular media (CHCM).

Además, han sido realizados 180 frotis sanguíneos con las muestras provenientes de explotaciones con sintomatología compatible. Estas extensiones han sido secadas al aire, fijadas con metanol durante 5 minutos y finalmente teñidas con colorante Giemsa, diluido al 5% durante 30 minutos (Yasini et al., 2012). Para la observación de estas preparaciones se ha

utilizado un microscopio óptico con un objetivo de inmersión (x100). Las observaciones microscópicas han servido para detectar formas compatibles con patógenos intraeritrocitarios y para obtener la fórmula leucocitaria.

3.4 Análisis estadístico

Toda la información obtenida en la encuesta epidemiológica y en las distintas pruebas analíticas es integrada en una misma matriz estadística y procesada con el paquete estadístico SPSS 20.0 con el fin de averiguar la relación estadística entre *A. ovis* / enfermedad y sus posibles factores de riesgo. La explotación es empleada como unidad de estudio por lo que finalmente se introducen 47 explotaciones para el estudio.

El estudio de la enfermedad se realiza de dos maneras:

- Criterio clínico: se centra en la categorización de las explotaciones valorando la presencia/ausencia de anaplasmosis clínica:
 - o Explotación sin anaplasmosis: no se observan animales con clínica compatible durante la visita y el ganadero no reconoce los síntomas cuando es preguntado.
 - o Explotación con anaplasmosis leve: el ganadero reconoce alguno de los síntomas compatibles cuando es preguntado. El porcentaje de animales jóvenes afectados es <1%. Nunca ha mostrado preocupación sobre ello. Su veterinaria nunca ha observado animales con sintomatología en la explotación.
 - o Explotación con anaplasmosis grave: el ganadero reconoce varios de los síntomas compatibles y está preocupado. El porcentaje de animales jóvenes afectados es >5%. Su veterinaria sí que ha observado animales con sintomatología en la explotación.

- Presencia del agente etiológico:
 - o Explotación libre de *A. ovis*: ninguna de las muestras analizadas mediante PCR ha resultado positiva.
 - o Explotación con presencia de *A. ovis*: una o varias de las muestras analizadas mediante PCR ha resultado ser positiva.

Los datos recogidos en la encuesta a los ganaderos son estudiados mediante regresión logística binaria (para la presencia del agente etiológico) o múltiple (para la variable del criterio clínico). También se analiza mediante pruebas no paramétricas de Chi cuadrado el estudio de las

variables incluidas en la encuesta y los criterios de determinación de la infección. Para aquellos casos en los que es posible (tablas 2x2) se calcula el riesgo relativo.

Los valores correspondientes a variables numéricas como recuentos obtenidos de las hematologías, censos, porcentajes de desvieje, etc. son analizados también mediante pruebas de ANOVA cuando las pruebas de normalidad son superadas o por pruebas no paramétricas en los casos que no se distribuyan de acuerdo a una distribución normal. Las pruebas no paramétricas empleadas son Mann-Whitney para la presencia del agente etiológico y Kruskal-Wallis para el criterio clínico. En todos los casos se asumen como significativos resultados con $p < 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio del cuadro clínico

De los 52 ganaderos encuestados durante la realización de este estudio, 21 (40,4%) mostraron clínica claramente compatible con el cuadro estudiado. El 57,1% de los ganaderos afectados (12 de 21) relató que la enfermedad afectaba principalmente a animales jóvenes. El resto de ganaderos afectados no dio importancia a la edad de los animales enfermos.

El 100% de los ganaderos afectados tenían o habían tenido animales con debilidad, anorexia y caquexia. Y el 95,2% de estos ganaderos (20 de 21) relataron haber visto animales con epifora entre los afectados. Otros síntomas como las cojeras, hematuria/hemoglobinuria o abortos fueron vistos en mucha menor proporción. Respecto al desvieje forzado de animales jóvenes el 76.2% (16 de 21) de los ganaderos afectados se vio obligado a hacerlo en mayor o menor medida.

Llama poderosamente la atención que el 95,2% de los ganaderos afectado haya observado epifora en algunos animales. Este síntoma no está descrito en la bibliografía asociado a anaplasmosis. Desconocemos cual puede ser la causa real.

Según nuestra experiencia el diagnóstico clínico de esta enfermedad es posible siempre y cuando exista una sospecha confirmada en la zona. A pesar de la falta de especificidad de la sintomatología, el hecho de que afecte principalmente a animales jóvenes facilita el diagnóstico.

4.2 Análisis hematológicos

De los 52 animales con clínica representativa analizados, 46 (88,5%) mostraron anemia normocítica normocrómica, siendo los parámetros “nº eritrocitos” y “porcentaje hematocrito” los que más comúnmente se vieron alterados.

Respecto a la serie blanca cabe destacar que 6 animales (11,5%) mostraron leucopenia y únicamente 1 animal (1,9%) mostró leucocitosis.

Parámetros hematológicos	Valor medio hematologías (n=52)	Error estándar	Valores de referencia
Leucocitos	5,91	0,37	4-12 10 ³ /mm ³
Linfocitos	48,00%	2,75%	40-75%
Neutrófilos	47,39%	2,54%	10-50%
Eosinofilos	3,67%	1,00%	0-15%
Eritrocitos	6,658	0,443	9-14 millones /mm³
Hematocrito	22,72	1,61	28-40 %
Hemoglobina	7,41	0,50	8-15 g/dl
Plaquetas	451,22	40,28	250-750 10 ³ /mm ³
VCM	34,17	0,69	28-42
HCM	10,81	0,13	8-12
CCMH	31,73	0,32	30-34

Tabla 7: valores medios de las hematologías realizadas.

4.3 Análisis qPCR de las explotaciones: prevalencia rebaño

De las 52 explotaciones visitadas, finalmente se analizaron mediante qPCR muestras de 47 de ellas. En 44 de las 47 explotaciones analizadas se ha demostrado la presencia de *A. ovis* mediante qPCR. Únicamente 3 explotaciones han mostrado ausencia completa de *A. ovis*. 36 de esas 44 explotaciones positivas han mostrado todos sus pools positivos.

Explotaciones +		Explotaciones -	Total explotaciones analizadas
100% pools +	<100% pools +		
36 (76,6%)	8 (17,02%)	3 (6,38%)	47 (100%)

Tabla 8: resultados del análisis qPCR en los diferentes rebaños de la comarca del Matarraña.

Estos resultados demuestran que *A. ovis* está presente en el 93,6% de las explotaciones muestreadas, lo que supone la mayor parte de los rebaños de la comarca.

	qPCR +	qPCR -
Explotaciones CON síntomas	25	0
Explotaciones SIN síntomas	19	3

Tabla 9: comparación entre síntomas y resultados análisis qPCR.

No se han encontrado relaciones significativas entre presencia/ausencia de *A. ovis* y la presencia/ausencia de anaplasmosis clínica. Tampoco se ha encontrado diferencias significativas entre las zonas geográficas norte/sur, en lo que a prevalencia de rebaño respecta. Estos resultados indican que la mera presencia de *A. ovis* en una explotación no es suficiente para explicar la ausencia o presencia de la enfermedad.

Otros estudios epidemiológicos sobre *A. ovis* muestran prevalencias individuales muy altas en climas favorables para los vectores. Por ejemplo, un estudio desarrollado en Sicilia muestra prevalencias individuales de un 47,3% (Alessandra and Santo, 2012), 91,1% en el norte de Túnez (Belkahia et al., 2014) y 82,5% en Portugal (Renneker et al., 2013b). En ninguno de estos estudios se describe la clínica de los animales muestreados ni el estado sanitario de las explotaciones.

Dada la alta sensibilidad de la técnica PCR, si se utilizara la metodología descrita en el presente trabajo para analizar muestras provenientes de las zonas donde se han realizado los estudios anteriormente citados, seguramente se obtendría una mayoría de explotaciones positivas, ya que basta que uno de los animales muestreados esté infectado para que la qPCR de un pool salga positiva y por consiguiente esa explotación se considere positiva.

Sería razonable pensar que las explotaciones con anaplasmosis grave presentarán una mayor prevalencia individual de la infección. Sin embargo, los análisis realizados en este estudio no son suficientes para evaluar la prevalencia individual dentro de cada rebaño, por lo que realmente desconocemos si existen diferencias entre los distintos tipos de explotaciones.

Aun con todo lo investigado hasta el momento no es posible descartar que otros agentes etiológicos estén involucrados, sobre todo teniendo en cuenta que no hay referencia en la bibliografía de brotes clínicos de anaplasmosis tan graves como el ocurrido en la comarca del Matarraña. Es necesario seguir investigando para poder descartar esta posibilidad.

La PCR ha demostrado ser una técnica fiable y muy específica. El hecho de analizar las muestras en "pool" ha demostrado ser una estrategia eficaz y económica para certificar presencia del patógeno en las explotaciones. Sin embargo, al utilizar esta metodología, se pierde información valiosa, en lo que a prevalencia individual de la infección se refiere. Además el hecho de que la

PCR sea cuantitativa tiene poca utilidad cuando las muestras son analizadas en “pool”, al contrario de si fueran analizadas individualmente.

4.4 Localización geográfica y presentación de la enfermedad

Tal y como se sospechó en un principio la presentación de la enfermedad clínica es diferente entre los sectores norte y sur de la comarca, a pesar de que *A. ovis* está presente en las explotaciones de ambas zonas en una proporción parecida.

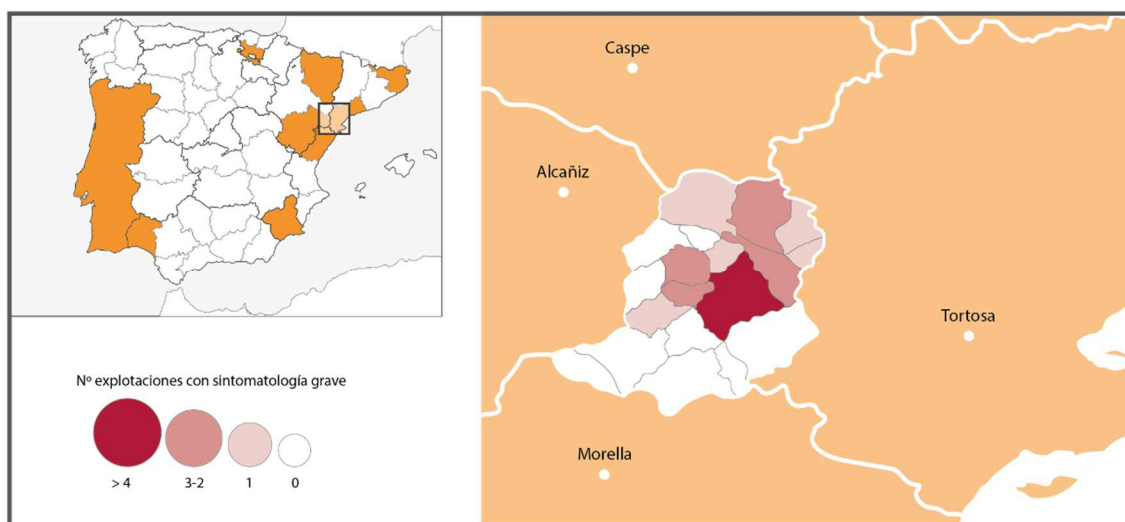


Figura 3: mapa de la comarca y número de explotaciones con anaplasmosis grave.

A continuación se compara en una tabla doble las diferencias entre “zona norte” y “zona sur” en lo que a sintomatología y análisis qPCR se refiere:

Tipos de explotación	Zona norte	Zona sur
Anaplasmosis grave	19 (61,3%)	0 (0%)
Anaplasmosis leve	1 (3,2%)	5 (31,2%)
Sin anaplasmosis	11 (35,5%)	11 (68,8%)

Tipos de explotación	Zona norte	Zona sur
qPCR +	29 (93,5%)	15 (93,7%)
qPCR -	2 (6,5%)	1 (6,3%)

Tabla 9: comparativas entre zona norte y sur.

La probabilidad de aparición de anaplasmosis grave en el norte es 2,36 (3,34-1,59 $p < 0,001$) veces mayor que en el sur de la comarca. Estas diferencias pueden tener su explicación en las

diferencias geográficas y climáticas entre los sectores norte/sur y en la presencia/ausencia de distintos vectores.

Si se comparan las alturas medias de los distintos grupos de explotaciones visitadas, se aprecia una diferencia de altura de 128 metros entre las explotaciones que presentan una clínica grave y las que presentan ausencia de los síntomas estudiados.

Anaplasmosis grave	Anaplasmosis leve	Ausencia de anaplasmosis
524 m	623 m	652 m

Tabla 10: promedio de la altura de los diferentes grupos de explotaciones.

En la comarca del Matarraña, a pesar de su reducido tamaño (926,06 Km²), se encuentran dos sectores naturales bien diferenciados. Al norte se encuentra el Bajo Matarraña, caracterizado por un clima similar al del Valle del Ebro, en el que predominan los espacios abiertos con pequeñas elevaciones, que conforman un territorio heterogéneo de cultivos de oliveras (*Olea europea*), almendreras (*Prunus dulcis*) y cereal de secano, intercalado por bosquetes de pino carrasco (*Pinus halepensis*). Mientras que al sur encontramos el Alto Matarraña, de mayor altitud (700 - 1396 m), emplazado en las estribaciones de la Cordillera Ibérica y de la Prelitoral Catalana, más húmeda, con grandes formaciones boscosas de pino negral (*Pinus nigra*) y pino silvestre (*Pinus sylvestris*) (Benavente Serrano and Thomson Listerra, 2003).

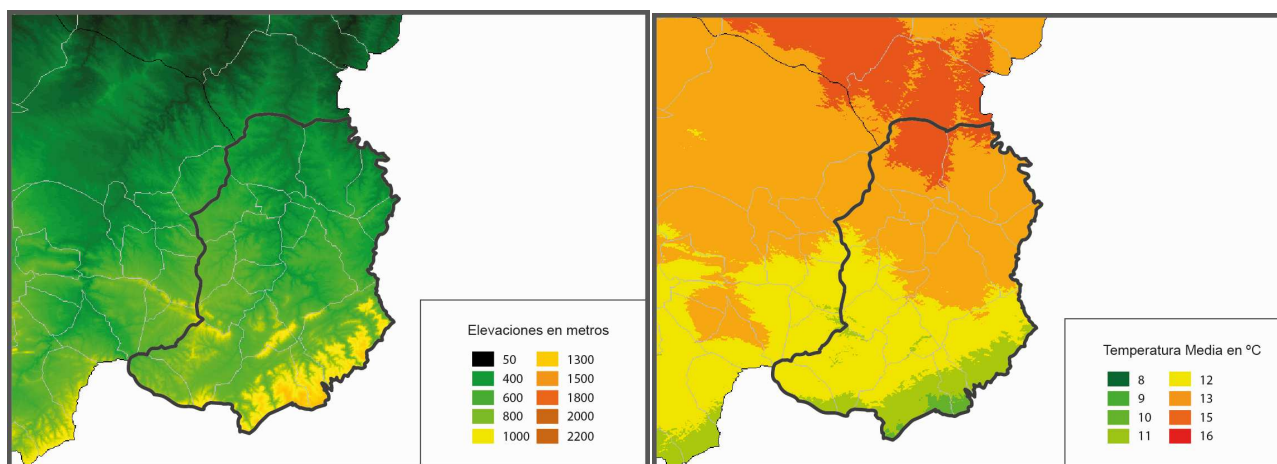


Figura 3: mapas de relieve y temperaturas medias anuales de la comarca del Matarraña.

(Fuente: Atlas Climático de Aragón)

En la figura 3 se pueden apreciar las diferencias de altura y temperatura media anual existentes entre en norte y el sur de la comarca. Aunque a primera vista puedan parecer pequeñas

diferencias, en realidad estas tienen una gran repercusión sobre los ecosistemas de cada parte, siendo estos muy diferentes como se ha explicado anteriormente.

El hecho de que la enfermedad esté claramente delimitada a la zona norte podría ser explicado por estas diferencias geográficas y climatológicas citadas. El principal vector de la anaplasmosis ovina son las garrapatas, y estas dependen plenamente del medio ambiente en el que se desarrollan. En la bibliografía se cita la importancia de la garrapata en la transmisión de la enfermedad por dos razones, en primer lugar porque se ha demostrado que la anaplasmosis es una enfermedad dosis-dependiente (Corona. B, 2004; Kocan et al., 2010; Torina et al., 2010) y la garrapata es el único hospedador intermediario en el que anaplasma se multiplica activamente quedando preparado para su inoculación a altas dosis en la glándulas salivares de la misma (Brayton, 2012; Kocan, 1995; Shkap et al., 2009). En segundo lugar, hay estudios recientes que cuando la garrapata se alimenta del hospedador vertebrado, no solo inyecta la dosis bacteriana, sino que también son inoculados una serie de metabolitos que interfieren en el sistema inmune del hospedador, favoreciendo la infección activa y el desarrollo de la enfermedad (Fuente et al., 2015). Estos hechos podrían explicar la marcada diferencia en la presentación clínica de la enfermedad en norte/sur, a pesar de haber tenido contacto con el microorganismo en toda la comarca.

Torina et al., 2008 explican en un estudio las diferentes prevalencias encontradas de *Anaplasma marginale*, *A. ovis* y *A. phagocytophilum* en los sectores este y oeste de la isla de Sicilia. Las diferencias son en su mayoría significativas y son atribuidas a diferencias en el manejo de los animales, a las distintas poblaciones de reservorios silvestres y sobre todo a las diferencias entre los hábitats más propicios para las distintas especies de garrapatas.

Sin embargo, lo expresado es, de momento, una hipótesis, la cual debería ser confirmada en futuros estudios sobre las poblaciones de vectores y las prevalencias individuales de *A. ovis* en los distintos tipos de explotaciones, para poder determinar el origen de las diferencias explicadas en el presente trabajo.

4.5 Relación entre vector y enfermedad

Hay numerosos factores que pueden afectar a las poblaciones de vectores, y en especial a las garrapatas. El clima, el suelo, el tipo de vegetación, la humedad, el ecosistema animal y el manejo de las especies ganaderas, influyen directa o indirectamente en las distribuciones de las distintas especies de garrapatas (Torina et al., 2008).

Durante las visitas a las explotaciones se han realizado muestreos esporádicos de garrapatas encontradas sobre los animales y en todos los casos la especie identificada ha sido *Rhipicephalus turanicus*, especie descrita como vector de *A. ovis* (Belkahia et al., 2014). Además en la encuesta los ganaderos fueron preguntados sobre los vectores potenciales de la enfermedad. Un 92% de los ganaderos encuestados veían garrapatas en los animales, siendo primavera la época de mayor cantidad. Y un 77% observaban tábanos, siendo verano la época de mayor cantidad.

A la pregunta de si habían visto mayor cantidad de garrapatas o tábanos en los últimos años, un 34,61% contestó que Sí. Y el 61,11% de estos ganaderos tenía un problema grave de anaplasmosis. La relación entre apreciar incremento de vectores y la presentación de anaplasmosis grave es significativa ($p < 0,05$). Un ganadero que ha detectado un incremento en los vectores tiene un 3,77 (12,53-1,13 $p = 0,039$) veces más riesgo de sufrir anaplasmosis grave.

Sin embargo, es cierto que algunas preguntas de la encuesta, como ésta última, pueden ser muy subjetivas. Por ello en la encuesta también se preguntaba si el ganadero sabía lo que era la anaplasmosis y como se transmite. A pesar de que un 57,69 % de los ganaderos encuestados conocían la enfermedad, esto no está relacionado de manera significativa ($p > 0,05$) con ninguna de las variables de respuesta subjetiva.

Sin embargo, serían necesarios estudios más detallados para determinar cómo influyen las diferencias en las poblaciones de vectores en la presentación clínica de la anaplasmosis.

4.6 Relación entre raza y enfermedad

En ovino se ha demostrado la influencia de la raza en la gravedad de los síntomas de la anaplasmosis (Ciani et al., 2013; Hurtado et al., 2015; Pieragostini et al., 2011), por ello ha sido un factor que se ha tenido en cuenta a la hora de explicar las diferencias clínicas observadas entre distintas explotaciones. En la comarca del Matarraña son tres las razas de ovino presentes:

RAZA	SIN ANAPLASMOSIS CLINICA	CON ANAPLASMOSIS CLÍNICA
Rasa Aragonesa	13 (54,2%)	11 (45,8%)
Ojinegra	19 (76%)	6 (24%)
Maellana	2 (33%)	4 (67%)

Tabla 11: comparativa entre la presentación de anaplasmosis clínica entre las distintas razas.

Aparentemente las observaciones muestran que la raza ojinegra presenta una menor tendencia a sufrir anaplasmosis clínica que el resto. Sin embargo, la relación entre raza y clínica no es estadísticamente significativa ($p > 0,050$), por lo que no es posible aseverar que en el presente

caso sea un factor determinante. Posiblemente si se aumentara el tamaño de muestra en futuros estudios sería posible averiguar con mayor exactitud cómo influye la raza en la presentación de la enfermedad estudiada.

4.7 Relación entre pastoreo y enfermedad

Otro aspecto preguntado en la encuesta epidemiológica han sido las rutinas de pastoreo durante las distintas épocas del año. Este aspecto es importante porque es durante el pastoreo cuando los animales tienen mayor riesgo de entrar en contacto con el vector, por lo que influye directamente en la presentación de anaplasmosis.

En este caso sí que se han encontrado diferencias significativas. Los rebaños que pastaron en el olivar durante la primavera presentan un riesgo 13,00 (109,50-1,543 $p=0,008$) veces mayor de sufrir anaplasmosis grave que los que no lo hicieron.

Este hecho no significa necesariamente que los vectores se encuentren específicamente en los olivares, sino que un clima que es favorable para su cultivo también lo es para los vectores de *A. ovis*.

En la comarca del Matarraña el cultivo de la olivera es mucho más común en el sector norte, ya que su menor altitud y las temperaturas menos frías le son favorables. Puesto que la mayoría de explotaciones afectadas se encuentran en la zona norte de la comarca, posiblemente este sea el origen de la relación estadística.

	SI pastoreo olivera en primavera	NO pastoreo olivera en primavera
Zona norte	<u>32 (91,4%)</u>	3 (8,6%)
Zona sur	6 (37,5%)	<u>10 (62,5%)</u>

Tabla 12: diferencias entre zonas en lo que a pastoreo de olivera en primavera se refiere.

De ser cierta esta hipótesis, el cultivo de la olivera podría ser utilizado como un marcador climático fácilmente utilizable para estimar el riesgo de aparición de anaplasmosis grave, siempre y cuando el clima de la zona de estudio sea similar al de la comarca del Matarraña.

5. CONCLUSIONES FINALES

Los animales afectados mostraron debilidad y anorexia en el 100% de los casos y epifora en el 95,2%. Además, en el 76,2% de las explotaciones afectadas se produjo un mayor desvieje de animales jóvenes. Siendo estos los síntomas más representativos de la enfermedad.

El 88,5% de animales con sintomatología clínica analizados mostraron una grave anemia. El recuento del número de eritrocitos y el porcentaje de valor hematocrito son parámetros válidos para el diagnóstico clínico de la enfermedad.

El 93,6% de las explotaciones analizadas mostraron presencia de *Anaplasma ovis* mediante la técnica qPCR. Esto indica que *A. ovis* es un patógeno ampliamente extendido en la comarca del Matarraña y que la mera presencia de la bacteria no es suficiente para realizar un diagnóstico de anaplasmosis clínica.

La probabilidad de aparición de anaplasmosis grave en el norte de la comarca del Matarraña es 2,36 veces mayor que en el sur, y del mismo modo, los rebaños que pastaron en el olivar durante la primavera presentan un riesgo 13,00 veces superior de sufrir anaplasmosis grave que los que no lo hicieron. Estos dos factores de riesgo pueden estar relacionados con la presencia o ausencia del vector, ya que la apreciación por parte del ganadero de un mayor número de garrapatas en el ganado en relación a la presencia de enfermedad clínica, muestra diferencias significativas, teniendo estas explotaciones 3,77 veces más riesgo de sufrir anaplasmosis grave.

Sin embargo, el estudio epidemiológico no muestra diferencias significativas en el tipo de manejo, protocolos sanitarios y alimentación de las explotaciones afectadas. Estos no parecen ser factores que afecten la aparición de sintomatología clínica.

La qPCR ha demostrado ser un método laboratorial fiable y útil para el diagnóstico de anaplasmosis. El muestreo empleado para la detección de la infección por *A. ovis* y el análisis de las mismas en "pools" de 5 muestras es un método válido para la detección de la bacteria, debiéndose basar el muestreo en la presencia de síntomas compatibles con la enfermedad.

6. FINAL CONCLUSIONS

Affected animals showed weakness and anorexia in the 100% of the cases and epiphora in the 95.2%. In addition, 76.2% of affected farms occurred in a major culling of young animals. These seem to be the more representative symptoms of the disease.

The 88.5% of the affected animals showed a severe anemia. The red blood cells count and the percentage of hematocrit value are valid parameters for the clinical diagnosis of the disease.

The 93.6% of the farms analyzed showed presence of *Anaplasma ovis* by PCR technique. This indicates that *A. ovis* is a pathogen that is widely spread in the Matarraña region and that the mere presence of the bacteria is not sufficient to make a diagnosis of clinical anaplasmosis.

The probability of occurrence of serious anaplasmosis in the North of the Matarraña region is 2.36 times more than in the South, and in the same way, herds which grazed in the olive grove during the spring time have 13,00 times higher risk of suffering serious anaplasmosis than those who did not. These two factors of risk can be related with the presence or absence of the vector, since the appreciation from the farmer of a greater number of ticks in the flock in relation to the presence of clinical disease shows significant differences, having these farms 3.77 times more risk of suffer serious anaplasmosis.

Nevertheless, the epidemiological study shows no significant difference in the type of management, health protocols and feeding of affected farms. These do not appear to be factors affecting the presence of clinical symptoms.

The qPCR has proven to be a reliable and useful technique for the diagnosis of anaplasmosis. The sampling used for the detection of infection by *A. ovis* and the analysis of them in pools of 5 samples is a valid method for the detection of the bacteria; sampling should be based on the presence of symptoms consistent with the disease.

7. VALORACIÓN PERSONAL Y AGRADECIMIENTOS

Durante la realización de este trabajo hay multitud de buenas personas que me han ayudado. En especial quiero agradecer a mis compañeros de curso Teresa Fanlo y Calasanz Jimenez, compañeros de aventura, su gran ayuda y apoyo prestados. A Delia Lacasta, mi tutora, por la gran docente que es y la paciencia que ha tenido conmigo. A las veterinarias de la ADS local, Nuria y Maru, porque sin su ayuda nada de esto habría sido posible. Al laboratorio EXOPOL por el gran apoyo que nos han dado y la cantidad de tiempo y esfuerzo que han dedicado a este estudio.

También quiero agradecer al profesor Agustín Estrada y al Instituto de Investigación de Recursos Cinegéticos toda la ayuda prestada. Y por último agradecer a todos los ganaderos que han invertido su tiempo en mostrarme sus explotaciones, espero que algún día lo estudiado en estos trabajos les sea de utilidad.

En lo personal he aprendido mucho realizando este trabajo, en especial me he dado cuenta de lo dura y exigente que es la investigación científica. Creo que este trabajo me ha servido para mejorar en muchos aspectos que son importante en la profesión veterinaria y me ha servido también para conocer la realidad del ovino en nuestra región.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Alessandra, T., Santo, C., 2012. Tick-borne diseases in sheep and goats: Clinical and diagnostic aspects. *Small Rumin. Res.* 106, S6–S11.
- Barandika, J.F., 2013. Infección por anaplasmas y piroplasmas en un rebaño ovino de raza Latxa a lo largo del periodo de pastoreo en monte. *Soc. Española Ovinotecnia y Caprinotecnia XXXVIII*.
- Bautista G., C.R., 1996. La respuesta inmune celular en anaplasmosis bovina. *Cienc. Veterinaria* 7, 315–329.
- Belkahia, H., Ben Said, M., El Hamdi, S., Yahiaoui, M., Gharbi, M., Daaloul-Jedidi, M., Mhadhbi, M., Jedidi, M., Darghouth, M.A., Klabi, I., Zribi, L., Messadi, L., 2014. First molecular identification and genetic characterization of *Anaplasma ovis* in sheep from Tunisia. *Small Rumin. Res.* 121, 404–410.
- Benavente Serrano, J.A., Thomson Listerra, T., 2003. Comarca del Matarraña, Comarcalización de Aragón, Gobierno de Aragón.
- Berggoetz, M., Schmid, M., Ston, D., Wyss, V., Chevillon, C., Pretorius, a. M., Gern, L., 2014. Tick-borne pathogens in the blood of wild and domestic ungulates in South Africa: Interplay of game and livestock. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 5, 166–175.
- Brayton, K. a., 2012. Transmisión de *Anaplasma marginale* por garrapatas. *Rev. Mex. Ciencias Pecu.* 3, 41–50.
- Brouqui, P., Bacellar, F., Baranton, G., Birtles, R.J., Bjoërsdorff, a., Blanco, J.R., Caruso, G., Cinco, M., Fournier, P.E., Francavilla, E., Jensenius, M., Kazar, J., Laferl, H., Lakos, a., Lotric Furlan, S., Maurin, M., Oteo, J. a., Parola, P., Perez-Eid, C., Peter, O., Postic, D., Raoult, D., Tellez, a., Tselentis, Y., Wilske, B., 2004. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 1108–1132.
- Carrquiry, R., 2010. Tristeza parasitaria : causas y prevención. *Bienestar y Salud Anim.* 56–58.
- 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.* 55, 71.
- Ciliberti, A., Gavier-Widén, D., Yon, L., Hutchings, M.R., Artois, M., 2015. Prioritisation of wildlife pathogens to be targeted in European surveillance programmes: Expert-based risk analysis focus on ruminants. *Prev. Vet. Med.* 118, 271–84.
- Corona. B, 2004. Anaplasmosis bovina. *REDVET VI*, 655–667.
- De La Fuente, J., Naranjo, V., Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Estrada-Peña, A., Almazán, C., Kocan, K.M., Martín, M.P., Gortázar, C., 2004a. Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (Acari: Ixodidae) collected from European wild boar (*Sus scrofa*) and Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in central Spain. *Eur. J. Wildl. Res.* 50, 187–196.

- De la Fuente, J., Ruiz-Fons, F., Naranjo, V., Torina, A., Rodríguez, O., Gortázar, C., 2008. Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. *Res. Vet. Sci.* 84, 382–386.
- De La Fuente, J., Torina, A., Caracappa, S., Tumino, G., Furlá, R., Almazán, C., Kocan, K.M., 2005. Serologic and molecular characterization of *Anaplasma* species infection in farm animals and ticks from Sicily. *Vet. Parasitol.* 133, 357–362.
- De La Fuente, J., Vicente, J., Höfle, U., Ruiz-Fons, F., Fernández De Mera, I.G., Van Den Bussche, R. a., Kocan, K.M., Gortazar, C., 2004b. *Anaplasma* infection in free-ranging Iberian red deer in the region of Castilla-La Mancha, Spain. *Vet. Microbiol.* 100, 163–173.
- Derdáková, M., Štefančíková, A., Špitalská, E., Tarageľová, V., Košťálová, T., Hrkľová, G., Kybicová, K., Schánilec, P., Majláthová, V., Várady, M., Peťko, B., 2011. Emergence and genetic variability of *Anaplasma* species in small ruminants and ticks from Central Europe. *Vet. Microbiol.* 153, 293–298.
- Djiba, M.L., Mediannikov, O., Mbengue, M., Thiongane, Y., Molez, J.F., Seck, M.T., Fenollar, F., Raoult, D., Ndiaye, M., 2013. Survey of Anaplasmataceae bacteria in sheep from Senegal. *Trop. Anim. Health Prod.* 45, 1557–1561.
- Dumler, J.S., Barbet, a F., Bekker, C.P., Dasch, G. a, Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with *Anaplasma*, *Cowdria* with Ehrlichia and Ehrlichia with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2145–65.
- Fuente, J. De, Estrada-peña, A., Cabezas-cruz, A., Kocan, K.M., 2015. *Anaplasma phagocytophilum* Uses Common Strategies for Infection of Ticks and Vertebrate Hosts. *Trends Microbiol.* xx, 1–8.
- Giadinis, N.D., Katsoulos, P.D., Chochlakis, D., Tselentis, Y., Ntais, P., Lafi, S.Q., Karatzias, H., Psaroulaki, A., 2015. *Anaplasma ovis* and *Leishmania infantum* in Greek cattle 205–209.
- Grau, H.E.G., Cunha Filho, N.A. Da, Pappen, F.G., Farias, N.A.D.R., 2013. Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22, 189–93.
- Hornok, S., Elek, V., de la Fuente, J., Naranjo, V., Farkas, R., Majoros, G., Földvári, G., 2007. First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary. *Vet. Microbiol.* 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). *Vet. Parasitol.* 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 Tick. Borne. Dis.* 6, 31–37.

- Jonsson, Reid, 2000. Global Climate Change and Vector Borne Diseases. *Vet. J.* 160, 87–89.
- Kocan, K.M., 1995. Targeting ticks for control of selected hemoparasitic diseases of cattle. *Vet. Parasitol.* 57, 121–151.
- 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, 95–107.
- Oie, 2012. Bovine Anaplasmosis. *Man. Diagnostic Tests Vaccines Terr. Anim.* 589–600.
- Pieragostini, E., Ciani, E., Rubino, G., Petazzi, F., 2011. Tolerance to Tick-Borne Diseases in Sheep : Highlights of a Twenty-Year Experience in a Mediterranean Environment. *Heal. Manag. - Differ. approaches Solut.* 451–476.
- Pulgarín, Á., Steffany, L., Restrepo, A., Guevara, J., Andrés, J., Echeverry, P., Vélez, V., Salas, Z., 2013. Artículos originales de investigación Hemoparasite infection in goats and sheep at five municipalities in north 8, 14–24.
- Reinbold, J.B., Johann, F., Hollis, L.C., Nickell, J.S., Riegel, C.M., Christopher, J. a, Ganta, R.R., 2010. Needle and Needle-Free Injection Techniques 71.
- Renneker, S., Abdo, J., Bakheit, M. a., Kullmann, B., Beyer, D., Ahmed, J., Seitzer, U., 2013a. Coinfection of Sheep with *Anaplasma*, *Theileria* and *Babesia* Species in the Kurdistan Region, Iraq. *Transbound. Emerg. Dis.* 60, 113–118.
- Renneker, S., Abdo, J., Salih, D.E. a, Karagenç, T., Bilgiç, H., Torina, a., Oliva, a. G., Campos, J., Kullmann, B., Ahmed, J., Seitzer, U., 2013b. Can *Anaplasma ovis* in Small Ruminants be Neglected any Longer? *Transbound. Emerg. Dis.* 60, 105–112.
- Reppert, E., Galindo, R.C., Breshears, M.A., Kocan, K.M., Blouin, E.F., Fuente, J. De, 2013. Demonstration of Transplacental Transmission of a Human Isolate of *Anaplasma phagocytophilum* in an Experimentally Infected Sheep 60, 93–96.
- Rymaszewska, a, Grenda, S., 2008. Bacteria of the genus *Anaplasma*—characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. *Vet. Med. (Praha).* 53, 573–584.
- Scoles, G. a, Broce, A.B., Lysyk, T.J., Palmer, G.H., 2005. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *J. Med. Entomol.* 42, 668–675.
- 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. *Vet. Microbiol.* 134, 254–260.
- Silvestre, B.T., Silveira, J. a. G., Meneses, R.M., Facury-Filho, E.J., Carvalho, A.U., Ribeiro, M.F.B., 2015. Identification of a vertically transmitted strain from *Anaplasma marginale* (UFMG3): Molecular and phylogenetic characterization, and evaluation of virulence. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 1–5. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.09.001

- Torina, A., Alongi, A., Naranjo, V., Estrada-Peña, A., Vicente, J., Scimeca, S., Marino, A.M.F., Salina, F., Caracappa, S., De La Fuente, J., 2008. Prevalence and genotypes of *Anaplasma* species and habitat suitability for ticks in a Mediterranean ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7578–7584.
- 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. *Trop. Anim. Health Prod.* 42, 1327–1331.
- Víchová, B., Majláthová, V., Nováková, M., Stanko, M., Hviščová, I., Pangrácová, L., Chrudimský, T., Čurlík, J., Peťko, B., 2014. *Anaplasma* infections in ticks and reservoir host from Slovakia. *Infect. Genet. Evol.* 22, 265–272.
- Wielinga, P.R., Gaasenbeek, C., Fonville, M., de Boer, a., de Vries, a., Dimmers, W., Akkerhuis Op Jagers, G., Schouls, L.M., Borgsteede, F., van der Giessen, J.W.B., 2006. Longitudinal Analysis of Tick Densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* Infections of *Ixodes ricinus* Ticks in Different Habitat Areas in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7594–7601.
- Woldehiwet, Z., 2010. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet. Parasitol.* 167, 108–122.
- Woldehiwet, Z., 2008. Immune evasion and immunosuppression by *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of tick-borne fever of ruminants and human granulocytic anaplasmosis. *Vet. J.* 175, 37–44.
- 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.* 7, 91–98.