



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Estudio descriptivo de la anaplasmosis en el ganado ovino

Descriptive study of anaplasmosis in sheep

Autor/es

Daniel López Santos

Director/es

Delia Lacasta Lozano

Aurora Ortín Pérez

Facultad de
Veterinaria

2020

ÍNDICE

RESUMEN	<i>Página 2</i>
SUMMARY	<i>Página 3</i>
INTRODUCCIÓN	<i>Página 4</i>
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	<i>Página 5</i>
METODOLOGÍA	<i>Página 5</i>
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	<i>Página 6</i>
1. El género <i>Anaplasma</i>	<i>Página 6</i>
2. Las garrapatas	<i>Página 9</i>
3. La anaplasmosis: zoonosis emergente	<i>Página 11</i>
4. <i>Anaplasma ovis</i>	<i>Página 12</i>
4.1. Epidemiología	<i>Página 14</i>
4.2. Cuadro clínico	<i>Página 17</i>
4.3. Respuesta inmune	<i>Página 19</i>
4.4. Diagnóstico	<i>Página 21</i>
4.5. Tratamiento	<i>Página 23</i>
5. El SCRUM y la anaplasmosis ovina	<i>Página 24</i>
CONCLUSIONES	<i>Página 26</i>
CONCLUSIONS	<i>Página 27</i>
VALORACIÓN PERSONAL	<i>Página 27</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>Página 28</i>
BIBLIOGRAFÍA	<i>Página 29</i>

RESUMEN

La anaplasmosis ovina, provocada principalmente por la bacteria *Anaplasma ovis*, es una patología con un cuadro clínico altamente inespecífico, que incluye debilidad, episodios febriles ocasionales y pérdida de peso, además de caracterizarse por una marcada anemia normocítica y normocrómica. La principal vía de transmisión es a través de vectores biológicos, como las garrapatas del género *Ixodidae*, y los animales permanecen infectados de por vida, existiendo riesgo de que se produzcan reactivaciones que den lugar de nuevo a la enfermedad.

En los últimos años, debido al cambio climático, se está diagnosticando la enfermedad en países con climatología menos benigna, puesto que el aumento de las temperaturas afecta tanto a la persistencia endémica de las garrapatas como a las interacciones parásito-hospedador. No obstante, en muchas ocasiones, se trata de una enfermedad poco notificada e infradiagnosticada en el ganado ovino. Esta patología tiene una mayor significación en países en desarrollo de zonas tropicales y subtropicales, en los que la enfermedad produce importantes pérdidas económicas, agravadas por la dificultad de realizar un diagnóstico efectivo debido a la ausencia de lesiones características y a la inespecificidad de su cuadro clínico.

El diagnóstico de la anaplasmosis ovina se ha realizado normalmente mediante la observación al microscopio de extensiones sanguíneas teñidas mediante el procedimiento de Giemsa en las que se aprecia la bacteria dentro de los eritrocitos, aunque este método se encuentra actualmente obsoleto. Gracias a los avances científicos, este método diagnóstico ha sido sustituido por pruebas serológicas (ELISA), y moleculares (PCR), que tienen como diana las proteínas de superficie del agente (*mSP5* y *mSP4*), detectando respectivamente anticuerpos frente a *mSP5* y el gen que codifica *mSP4*. Se ha demostrado experimentalmente que el tratamiento de larga duración con doxiciclina es efectivo frente a la enfermedad, pero la principal estrategia de control es la prevención, mediante la actuación sobre las garrapatas y su ciclo biológico.

Existen pocos estudios relacionados con *Anaplasma ovis* y el ganado ovino en España. El SCRUM o Servicio Clínico de Rumiantes de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, a raíz de un caso clínico de anaplasmosis ovina recibido en 2014, ha estado desarrollando distintas líneas experimentales con el objetivo de aumentar los conocimientos sobre esta enfermedad, de la que se dispone de escasa información.

SUMMARY

Descriptive study of anaplasmosis in sheep

Ovine anaplasmosis, caused by the bacterium *Anaplasma ovis*, is a disease with a highly nonspecific clinical picture, which includes weakness, occasional febrile episodes and weight loss, in addition to being characterized by a marked normocytic and normochromic anemia. The main route of transmission is through biological vectors, such as ticks of the genus *Ixodidae*, and animals remain infected for life, with the risk of reactivations leading to the disease.

In recent years, due to climate change, the disease is being diagnosed in countries with less benign climatology, as rising temperatures affect both the endemic persistence of ticks and parasite-host interactions. However, in many cases, it is a disease that is poorly reported and underdiagnosed in sheep. However, this disease has a greater significance in developing countries in tropical and subtropical zones, where the disease produces significant economic losses, aggravated by the difficulty in carrying out an effective diagnosis due to the absence of characteristic lesions and the lack of specificity of its clinical picture.

The diagnosis of ovine anaplasmosis has normally been made by observing under a microscope Giemsa-stained blood smears in which the bacteria are seen inside the erythrocytes, although this method is now obsolete. Thanks to scientific advances, this diagnostic method has been replaced by serological tests, such as ELISA, and by molecular tests, such as PCR, based on surface proteins of the agent (*mcp5* and *mcp4*), which detect antibodies against *mcp5* and the gene that encodes *mcp4*, respectively. It has been experimentally demonstrated that doxycycline in long-term administrations is an effective treatment for the disease but prevention is an essential control strategy and for that it is recommended to act on ticks and their biological cycle.

There are few studies related to *Anaplasma ovis* and sheep in Spain. The SCRUM or Ruminant Clinical Service of the Veterinary Faculty of Zaragoza, following a clinical case of sheep anaplasmosis received in 2014, has been developing different experimental lines in order to increase knowledge about this disease of which little information is currently available.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Anaplasma* son capaces de infectar a un amplio rango de hospedadores, incluyendo tanto a los humanos como a los animales domésticos y salvajes. En algunos países en los que el agente es endémico, la anaplasmosis constituye un problema a nivel veterinario y a nivel humano, destacando a las especies que son capaces de producir daños en el ganado y ocasionar, a su vez, pérdidas económicas derivadas de la disminución del rendimiento productivo y de los gastos del control veterinario (Dumler *et al.*, 2001; Torina *et al.*, 2010).

La principal especie relacionada con la anaplasmosis ovina es *Anaplasma ovis*. Esta bacteria, perteneciente a la familia *Anaplasmataceae*, es un patógeno intraeritrocitario de las ovejas, cabras y rumiantes salvajes, principalmente (Yasini *et al.*, 2012). El cuadro clínico que produce en los pequeños rumiantes es altamente inespecífico y, en ocasiones, difícil de detectar, pues lo más característico lo constituyen los picos febriles, la anemia y la debilidad ocasional, entre otros (Renneker *et al.*, 2013). Además, es capaz de predisponer a los animales a otras infecciones, dando lugar a otras enfermedades y, en algunas ocasiones, a la muerte (Kocan *et al.*, 2004).

Gracias a las nuevas técnicas diagnósticas, se está notificando un incremento en la incidencia de los casos y, además, ha podido aislarse *Anaplasma* en humanos, por lo que es necesario aplicar un enfoque zoonótico de esta enfermedad. A pesar de ello, los estudios y la información disponible relacionados con esta enfermedad son escasos, y más en el caso de la anaplasmosis ovina, llegando al punto en el que algunos autores consideran que es una enfermedad infravalorada (Doudler *et al.*, 2010).

Este hecho expuesto anteriormente, constituye un punto de vital importancia en países en vías de desarrollo en los que el ovino y el caprino constituyen una importante fuente de ingresos económicos, ya sea mediante la obtención de carne, leche, lana o piel. En estos puntos geográficos, generalmente de clima tropical y subtropical en los que el cambio climático está provocando un aumento en las temperaturas, apenas se aplican medidas preventivas contra los principales vectores de la enfermedad, en este caso garrapatas del género *Ixodidae* (Bouchard *et al.*, 2019).

El aumento de las temperaturas está produciendo un aumento tanto en la población de los vectores como en la velocidad de su ciclo vital en países con climas más adversos, resultando así en un aumento de los animales infectados y diagnosticados en países donde, hasta ahora, nunca se había diagnosticado la enfermedad, como es el caso de España, donde ha sido diagnosticada por primera vez en el ganado ovino muy recientemente.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Partiendo de la reciente descripción de esta enfermedad en la especie ovina en España y de lo expuesto anteriormente, el objetivo principal del presente Trabajo Fin de Grado es realizar una revisión bibliográfica sobre la anaplasmosis, centrándose, sobre todo, en la patología que provoca *Anaplasma ovis* en el ganado ovino, incluyendo aspectos como la transmisión, el cuadro clínico, los métodos diagnósticos, así como su prevención y su impacto económico y sanitario, abordándola desde un punto de vista zoonótico.

METODOLOGÍA

Con el fin de alcanzar los objetivos relatados anteriormente, se realizará una revisión bibliográfica sobre esta enfermedad, particularmente la padecida por el ganado ovino, y su agente causal *Anaplasma ovis*. Para ello, se revisarán recursos bibliográficos tales como libros especializados (tanto de la biblioteca de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza como libros en plataformas de internet), artículos científicos empleando bases de datos como PubMed o ScienceDirect y motores de búsqueda como Google Scholar y AlcorZe, además de utilizar un gestor de referencias bibliográficas, como es el caso de Mendeley.

Por último, se accederá a los resultados de otros Trabajos de Fin de Grado experimentales relacionados con esta temática realizados con ovejas y corderos del SCRUM (Servicio Clínico de Rumiantes de la Universidad de Veterinaria de Zaragoza).

Las palabras clave que se han utilizado para la búsqueda de información y artículos académicos han sido sheep, anaplasmosis, *Anaplasma spp* y *Anaplasma ovis*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. EL GÉNERO *ANAPLASMA*

Con el término anaplasmosis se hace referencia al grupo de infecciones causadas por bacterias del género *Anaplasma* que son transmitidas generalmente por garrapatas duras, principalmente del género *Ixodidae*, y que afectan tanto a humanos como a animales. Estas poseen una distribución universal y existen diferentes especies capaces de transmitir la infección (Rymaszewka y Grenda, 2008).

Las bacterias del género *Anaplasma* son Gram negativas, pleomórficas y de crecimiento intracelular obligado en las células sanguíneas de los mamíferos, replicándose en unas vacuolas derivadas de la membrana celular de las células que infectan, principalmente eritrocitos, aunque algunas especies presentan tropismo por leucocitos y plaquetas (Blanco *et al.*, 2007). En dichas células diana, se aprecian como inclusiones intracelulares denominadas “mórulas”, compuestas de 8 a 12 cuerpos iniciales y de un tamaño de 0,3 micras (0.2-0,5), que se tiñen de azul oscuro a púrpura con tinciones Romanowsky, Giemsa, Wright o Diff-Quik (Dumler *et al.*, 2001; Olguín y Bernal, 2004).

Ultraestructuralmente, se puede apreciar que las inclusiones contienen una o varias bacterias en dos formas posibles: la denominada “forma de núcleo denso”, que posee una condensación central o excéntrica densa de hebras de cromatina, y la “forma reticulada”, que contiene una matriz suelta homogénea de hebras de cromatina, entre las que se encuentran los ribosomas. Las formas reticuladas se identifican normalmente *in vivo*, mientras que las formas de núcleo denso se identifican predominantemente *in vitro* (Battilani *et al.*, 2017).

El nombre de este género de bacterias procede del griego “an”, que significa “sin” y “plasma”, que hace referencia a “cualquier cosa formada o moldeada” (Battilani *et al.*, 2017). Taxonómicamente pertenecen al orden *Rickettsiales* desde 2001 (Rymaszewka y Grenda, 2008), habiendo sido reorganizadas recientemente basándose en el análisis filogenético del ARN ribosómico 16S, entre otros, además de atender al desarrollo de nuevas técnicas moleculares que han permitido secuenciar el genoma de estas bacterias (Dumler *et al.*, 2001; Rymaszewka y Grenda, 2008). El género *Anaplasma* se incluye en la familia *Anaplasmataceae*, que, a su vez, se engloba dentro del filo *Proteobacteria* (Figura 1). La familia *Anaplasmataceae* incluye también a

los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*, *Neoehrlichia*, *Aegyptianella* y *Wolbachia* (Dumler *et al.*, 2001).

Se conocen varias especies pertenecientes al género *Anaplasma*, 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 (Rymaszewka y Grenda, 2008). Se distinguen *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis* y *A. bovis* (todas ellas especies patógenas de rumiantes, tanto domésticos como silvestres; aunque en un inicio se considerara a *A. bovis* patógena de los bovinos, varios estudios en distintos países han demostrado que los pequeños rumiantes también son reservorio de este agente), *A. platys* (especie patógena del perro) y *A. phagocytophilum* (especie patógena de varias especies, incluyendo la humana) (Rar y Golovljova, 2011). Recientemente, se ha identificado y aislado *A. capra*, y, aunque no se conoce todavía el tipo de vector biológico que lo transmite y la célula huésped, se considera que provoca un cuadro subclínico en el ganado caprino (Yang *et al.*, 2019).

Domain (Super Kingdom)	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Class	<i>Alphaproteobacteria</i>
Order	<i>Rickettsiales</i>
Family	<i>Anaplasmataceae</i>
Genus	<i>Anaplasma</i> ^a
Species	<i>A. bovis</i> ^b , <i>A. centrale</i> ^c , <i>A. marginale</i> ^a , <i>A. ovis</i> ^d , <i>A. phagocytophilum</i> ^e , <i>A. platys</i> ^f

Fig. 1. Taxonomía de la familia *Anaplasmataceae* de acuerdo a la reclasificación de Dumler *et al.* en 2001.

Las células de los reservorios actúan como un ambiente en el que el patógeno puede vivir y proliferar durante varios años, pero en muy pocas ocasiones provoca patología. Se considera que este agente induce una enfermedad clínica leve, sin embargo, el cúmulo de

pequeños déficits puede provocar el aumento del impacto económico debido a la amplia distribución geográfica del patógeno (Liu *et al.*, 2019).

En una revisión sistemática con datos obtenidos entre 1978 y 2018 sobre la prevalencia de *Anaplasma sp.* realizada por Urán *et al.* en el año 2019, se ha evidenciado tanto en animales como en humanos que existen diferencias en la prevalencia según el sexo (mayor en machos que en hembras) y edad (mayor en grupos de mayor edad). Como se muestra en la Figura 2, los países en los que la anaplasmosis es más frecuente son Brasil, México, Irán e India (prevalencia mayor al 50%), seguidos por España y otros como Marruecos y Hungría, con una prevalencia de entre el 20 y el 50%, y las especies más afectadas son los équidos, seguidos de los ciervos, de los rumiantes (domésticos y silvestres) y de los perros (Urán *et al.*, 2019).

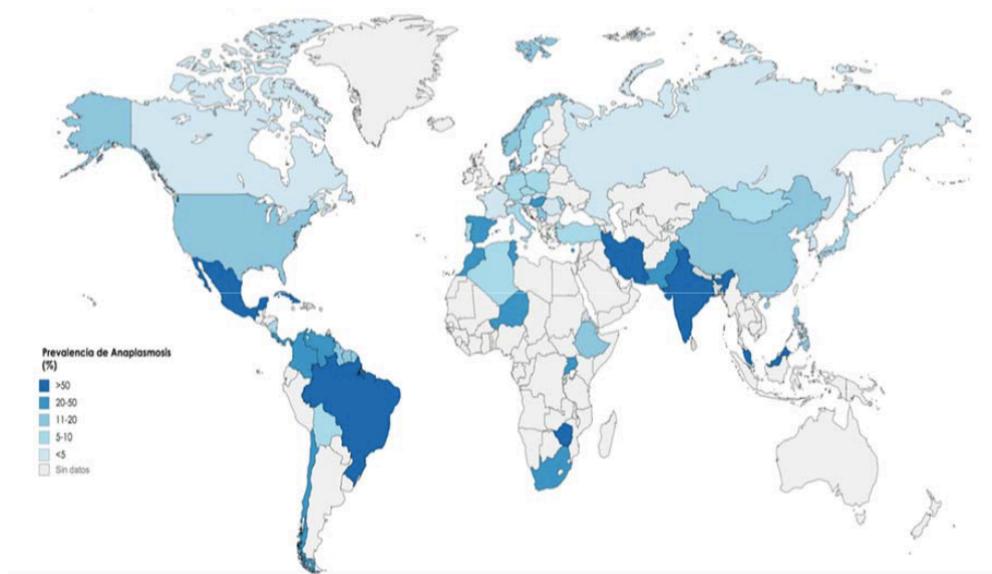


Fig. 2. Prevalencia mundial de *Anaplasma spp.* según los países incluidos en la revisión bibliográfica de Urán *et al.*, en 2019.

En los últimos años, ha surgido un creciente interés, especialmente en las especies *A. marginale*, *A. ovis* y *A. phagocytophilum*, y se relaciona, sobre todo, con la conexión que existe entre dichas especies con los animales de granja y, también, aunque en menor grado, con el ser humano (Rymaszewka y Grenda, 2008).

2. LAS GARRAPATAS

Las garrapatas son consideradas uno de los mayores problemas en la sanidad veterinaria, pues estos ectoparásitos pueden transmitir directamente por sus mordiscos agentes infecciosos, incluyendo virus, bacterias y protozoos (Hurtado y Giraldo-Ríos, 2018). Son parásitos externos temporales que se alimentan de la sangre de los vertebrados terrestres en alguna etapa de su ciclo biológico, existiendo varias especies de considerable interés e importancia al actuar como vectores de una gran cantidad de patologías tanto para humanos como para animales (Walker et al., 2005; Hurtado y Giraldo-Ríos, 2018).

Dentro del orden *Acarii*, el suborden *Ixodida* incluye tres familias de garrapatas: *Argasidae*, *Nuttalliellidae* e *Ixodidae* (Keirans y Robbins, 1992). La familia *Ixodidae* se compone de aproximadamente 13 géneros, de los cuales cabe destacar las familias *Rhipicephalus* y *Dermacentor*, puesto que estas garrapatas son los vectores biológicos de la anaplasmosis, como es el caso de *Anaplasma ovis* (Stiller et al., 1999; Walker et al., 2005).

La familia *Ixodidae* también es conocida como el grupo de las garrapatas duras, puesto que poseen un escudo de quitina que cubre completamente la zona dorsal del macho adulto, mientras que, en la hembra adulta, en la larva y en la ninfa, sólo se extiende por una pequeña área (Hurtado y Giraldo-Ríos, 2018). *Anaplasma* es vehiculada por estas garrapatas duras principalmente, incluyendo *Rhipicephalus bursa*, *Dermacentor silvarum*, *D. marginatus*, *D. andersoni* y *Hamephysalis sulcata* (Rymaszewska y Grenda, 2008; Hurtado y Giraldo-Ríos, 2018). En las Figuras 3 y 4 se muestran imágenes de algunas de estas especies.

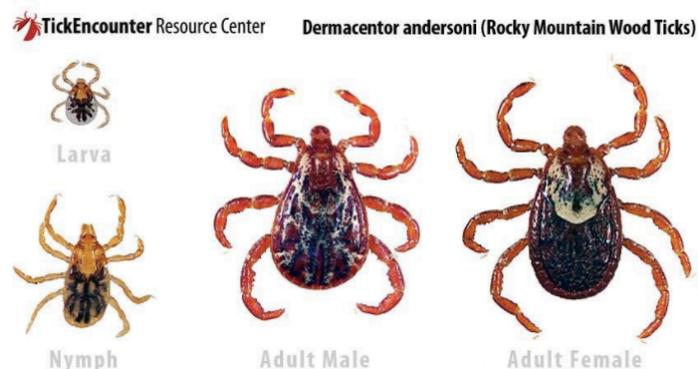


Fig. 3. *Dermacentor andersoni* en las distintas fases de crecimiento.
Fuente: Tick Encounter Resource Center, Universidad de Rhode Island



Fig. 4. *Rhipicephalus bursa* en su fase adulta.
Fuente: Tick ID, Universidad de Bristol

Estos ácaros se alimentan periódicamente de sangre, con largos intervalos entre comidas. Al fijarse y alimentarse de su hospedador dañan los tejidos de esa misma zona, y se produce una reacción variable, que incluye irritación, inflamación o hipersensibilidad. A su vez, se producen lesiones que pueden predisponer a un proceso de dermatitis localizada, infecciones bacterianas secundarias o al desarrollo de una miasis. Cada vez que las garrapatas se alimentan se produce estrés y debilidad en los animales, acrecentándose este efecto si existe un alto grado de infestación, afectando a la productividad de leche y carne, y provocando un aumento de la morbilidad y, en muchos de los casos, de la mortalidad (Hurtado y Giraldo-Ríos, 2018). En conclusión, uno de los puntos más peligrosos de la infestación por garrapatas lo constituye su capacidad de ser tanto parásitos obligados como vectores de un gran importante número de enfermedades bacterianas, víricas y parasitarias (Estrada-Peña, 2015).

Las bacterias del género *Anaplasma* se localizan en las glándulas salivares de la garrapata, formando racimos dentro de las vacuolas, habiéndose multiplicado previamente en las células del intestino y diseminándose por todo el organismo tras haber mordido a un animal infectado (Kocan *et al.*, 2010), existiendo también la posibilidad de la transmisión de forma transestadial (de larvas a ninfas y de ninfas a adultos), aunque no se ha podido demostrar la transmisión transovárica (Kocan *et al.*, 1992; Battilani *et al.*, 2017). Lo más posible es que la transmisión se inicie en el estadio de ninfa. Estas se alimentan de animales infectados; más tarde, cuando llegan a la etapa de adultos, se alimentan de animales susceptibles, produciéndose de esta manera la infección, aunque parece que tanto adultos, como ninfas, y larvas son capaces de transmitir la enfermedad (Kocan *et al.*, 1992). Un factor de riesgo de vital importancia lo constituyen las zonas geográficas en las que las garrapatas son endémicas (Urán *et al.*, 2019).

Existen varias especies de garrapatas en la península ibérica con importancia tanto en salud animal como en humana, además, en España, se ha demostrado la presencia de *Anaplasma* en algunos géneros de garrapatas, incluyendo *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Hyalomma*, *Dermacentor* y *Amblyomma* (Kocan *et al.*, 1992; Estrada-Peña, 2015).

3. LA ANAPLASMOSIS: ZONOSIS EMERGENTE

La anaplasmosis, junto a la ehrliquiosis y otras patologías provocadas por agentes intracelulares, son consideradas zoonosis emergentes. El número de casos en humanos ha aumentado recientemente de forma significativa debido a diversos factores: en primer lugar, se ha producido un aumento en la detección de enfermos en los últimos años debido a la gran mejora y a los avances en las técnicas diagnósticas, además de la vigilancia epidemiológica en todo el mundo. El principal patógeno dentro del grupo aislado en humanos es *A. phagocytophilum*, provocando la patología denominada anaplasmosis humana granulocítica (Doudier *et al.*, 2010).

El primer caso de esta patología en Estados Unidos se reportó en Minnessota, en 1994, en el que seis pacientes que presentaban fiebre se presentaron al hospital. En las analíticas sanguíneas de estos enfermos se evidenciaron las mórulas en los eritrocitos, y el agente causal se identificó como un patógeno que nunca había sido detectado previamente en los humanos, con un 99,9% de similitud genética con *Ehrlichia phagocytophila* y un 99,8% con *Ehrlichia equi*. Tras realizarse, en 2001, la reorganización de la familia *Anaplasmatacea*, se reidentificó al agente como *A. phagocytophilum*. El número de casos aumentó en Estados Unidos desde esta fecha, produciéndose un incremento del 30%, desde 2004. Por otro lado, en Europa, *A. phagocytophilum* era conocido como un patógeno de los animales de abasto desde 1930, y fue notificada por primera vez su presencia en équidos en 2002. En 1995, se describió el primer caso en humanos, y en 1997 se confirmó. En los siguientes años, al igual que en Estados Unidos, el número de casos aumentó y se extendió, diagnosticándose en España, Suecia, Noruega, Francia e Italia, aunque solamente fueron notificados 70 casos hasta 2004 (Doudier *et al.*, 2010).

La patología en humanos es considerada como una enfermedad estacional, ya que los casos se reportan principalmente durante el verano y la primavera, cuando las actividades al aire libre aumentan, además de otras actividades recreativas relacionadas con las áreas

boscosas, donde se produce el contacto con reservorios salvajes y con las garrapatas. El aumento de las poblaciones de estos reservorios, como es el caso de los ciervos, también favorece al aumento del número de las garrapatas (Doudier *et al.*, 2010).

En 2007, en Chipre, una mujer de 27 años fue hospitalizada con un historial de fiebre (39,5°C) durante los 11 días previos, desencadenado por el mordisco de una garrapata. Fue hospitalizada y tratada con cefixima y cefradina. La fiebre no remitió, y en el examen clínico se evidenció hepatoesplenomegalia, además del aumento de tamaño de un linfonodo. Presentaba, además, anemia moderada y trombocitopenia. Una de las muestras de sangre fue positiva a *Anaplasma ovis*. Tras estar hospitalizada durante 17 días, y habérsele administrado doxiciclina, ceftriaxona y cilastatia, se le dio el alta hospitalaria (Chochlakis *et al.*, 2010).

A pesar de existir pocos estudios relacionados con *A. ovis*, se consideró de vital importancia iniciar algunas líneas experimentales sobre la anaplasmosis ovina debido a su capacidad de provocar patologías en humanos. Además, con este nuevo enfoque zoonótico se estudia la posibilidad de la existencia de nuevos vectores del patógeno como, por ejemplo, más tipos de garrapatas, junto a los posibles efectos del cambio climático en la biología vectorial (Renneker *et al.*, 2013).

4. ANAPLASMA OVIS

Anaplasma ovis es el principal agente patógeno que provoca anaplasmosis en ovejas, cabras y rumiantes salvajes en Asia, África, Europa y Estados Unidos, siendo típicamente menos patógeno en cabras, e infectando raramente a bovinos (Liu *et al.*, 2019). Otras especies de *Anaplasma*, como es el caso de *A. bovis*, *A. phagocytophilum* y *A. capra*, son capaces de producir la anaplasmosis en el ganado ovino, aunque de forma menos frecuente, mientras que *A. marginale* se ha descrito en casos de anaplasmosis ovina subclínica (Torina y Caracappa, 2012; Yang *et al.*, 2019). En contraste con *A. phagocytophilum*, *A. ovis* es específico del hospedador y exhibe un nivel más bajo de diversidad genética en diferentes regiones geográficas. *A. phagocytophilum* tiene una amplia gama de hospedadores y se han identificado numerosas cepas genéticamente distintas (Yang *et al.*, 2019).

A. ovis está altamente diseminado por el sur de Europa, y ha sido el agente implicado en casos descritos en Bulgaria, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Italia, Portugal, Rumanía y

Turquía (Stuen, 2016), y más recientemente en España (Jiménez, 2019). A lo largo de los años, se ha considerado que este agente da lugar a una enfermedad clínica leve, por lo que no ha sido contemplada su importancia como patógeno, a pesar de provocar una infección generalizada del ganado y pérdidas de productividad, de lo que se concluye que el impacto económico de *Anaplasma ovis* puede estar siendo subestimado (Renneker *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2019), sobre todo por los costes asociados al tratamiento de la enfermedad y a las pérdidas productivas que genera (Tumwebaze *et al.*, 2020).

En los pequeños rumiantes, la principal vía de transmisión descrita en África, Asia y Europa, la constituye la garrapata *Rhipicephalus bursa*, mientras que en Oceanía y América es *Dermacentor andersoni* (Friedhoff, 1997). El primer caso fue registrado por Bevan en 1912, aunque se desconocen en gran medida los datos relacionados con su patogenia, tratamiento y epidemiología, no como sucede con otras especies de *Anaplasma* (Renneker *et al.*, 2013).

El signo clínico característico de la anaplasmosis ovina es la anemia, que inicialmente es normocítica (volumen corpuscular medio normal) y normocrómica (concentración de hemoglobina corpuscular media normal), que evoluciona a anemia macrocítica (volumen corpuscular medio aumentado) y normocrómica (Yasini *et al.*, 2012). La anemia se acompaña de otros signos clínicos generales inespecíficos, como fiebre, fatiga, anorexia, disminución de la producción y abortos ocasionales, pero con una baja tasa de mortalidad (Cabezas-Cruz *et al.*, 2019). No obstante, al igual que acontece con otras bacterias del género *Anaplasma*, la infección por *A. ovis* puede predisponer a otras infecciones microbianas o parasitarias, dando lugar a una exacerbación de los anteriores signos clínicos y, en ocasiones, la muerte. Además, la bacteria por si misma también puede llegar a ser mortal, aunque se desconocen los factores que hacen que en algunos rebaños se produzcan elevados porcentajes de mortalidad (Kocan *et al.*, 2010).

El impacto económico de la infección por *A. ovis* en los rebaños es de mayor importancia en los países donde las poblaciones animales consisten fundamentalmente en ovejas y cabras, sin embargo, la resistencia adquirida frente a algunas cepas de *A. ovis* en los países endémicos podría dificultar la evaluación de las pérdidas económicas reales provocadas por dicho agente (Torina *et al.*, 2006; Cabezas-Cruz *et al.*, 2019). De vital importancia también son los focos epidémicos, pues en ocasiones, cuando la enfermedad es endémica, el sistema inmune competente de los animales evita que se produzcan grandes pérdidas (Torina *et al.*, 2006). El gran número de casos de infecciones concurrentes entre *A. ovis* y *A. phagocytophilum* encontrados en el estudio de Torina *et al.* en el año 2010 sugiere que las ovejas con una pobre

condición sanitaria son más susceptibles a múltiples infecciones por parte de *Anaplasma*, resultando en un aumento del riesgo tanto para la salud humana como para la salud animal (Torina *et al.*, 2010).

Al constituir los pequeños rumiantes una fuente importante de carne, leche, lana y cuero en diferentes países, además de jugar un papel vital en la seguridad alimentaria, la presencia de garrapatas puede limitar en gran medida los sistemas de producción, provocando pérdidas tanto directas como indirectas, siendo las pieles de cordero particularmente susceptibles al daño. En las últimas décadas, el impacto socio-económico de los pequeños rumiantes ha crecido en todo el mundo, por lo que está aumentando la repercusión de las patologías de estos animales. Las pérdidas atribuidas a las enfermedades transmitidas por garrapatas incluyen mortalidad, pérdidas de producción, diagnóstico, tratamiento veterinario y control de los gastos, además de las pérdidas indirectas por todo lo relacionado con los planes de prevención y control de los costes (Hurtado y Giraldo-Ríos, 2018).

4.1. Epidemiología

Los pequeños rumiantes, como se ha nombrado anteriormente, constituyen una importante fuente de carne, leche, cuero y lana en muchas áreas del mundo, especialmente donde el clima es seco y cálido, y donde el pasto es escaso. Debido a esto existe una creciente demanda de una mejor comprensión de las enfermedades que afectan a estos animales, ya que una disminución de la productividad puede suponer un gran problema en algunas regiones del mundo (Renneker *et al.*, 2013). El clima cálido y húmedo favorece la supervivencia de las garrapatas, mientras que las bajas temperaturas inhiben su crecimiento (Hurtado y Giraldo-Ríos, 2018).

Anaplasma ovis se transmite, principalmente, por la picadura de garrapatas duras, pero aún así existen otras posibles vías de transmisión, como, por ejemplo, las picaduras de insectos hematófagos y la exposición a fómites contaminados con sangre de infectados (Cabezas-Cruz *et al.*, 2019). Recientemente, se ha detectado la presencia de *A. ovis* en *Melophagus ovinus*, también conocida como melófago o “garrapata del ovino”, y de igual manera, se reportó el papel de las moscas e insectos hematófagos como transmisoras de la enfermedad, como es el caso del tábano o *Tabanus sp.* o de la mosca de los establos o *Stomoxys calcitrans* (Hashemi-

Fersharki, 1997; Silva y Fikrig, 1997; Hornok *et al.*, 2007). Algunos autores consideran que existe un gran número de artrópodos que tienen un papel fundamental en la diseminación de la enfermedad, pero que están siendo infravalorados (Silva y Fikrig, 1997).

Existen otros vectores, como es el caso de las agujas, la denominada transmisión iatrogénica, considerándose uno de los factores de riesgo más importantes las prácticas veterinarias, como es el caso de la vacunación, utilizando la misma aguja para un gran número de animales (Rymaszewska y Grenda, 2008; Gharbi *et al.*, 2015). En conclusión, los métodos de transmisión mecánica se basan en el contacto de sangre de animales infectados con otros sanos.

Los brotes agudos son raros, y se dan principalmente en condiciones de estrés severo, como es el caso del clima cálido, de la desnutrición, de la baja condición corporal, de los transportes de largas distancias y del movimiento de animales (Cabezas-Cruz *et al.*, 2019). Algunos estudios demuestran que la máxima incidencia se produce durante los meses de junio y julio, periodo en el cual la temperatura es alta, favoreciendo la actividad de las garrapatas y debilitando el sistema inmune de los corderos (Gharbi *et al.*, 2015). También, la gravedad de la enfermedad y de la sintomatología depende de factores propios del animal, como es el caso de la edad, la raza, la inmunización previa, la dosis infectiva y la condición corporal (Torina *et al.*, 2010)

La preocupación por la transmisión de agentes infecciosos entre los animales silvestres y el ganado está aumentando, especialmente en las áreas donde se comparten zonas comunes de pastoreo, como es el caso de Andalucía. Se conoce que tanto el ciervo rojo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) como el jabalí europeo (*Sus scrofa*) son potenciales reservorios salvajes de la infección, y recientemente, tras un estudio, se ha incluido el corzo europeo (*Capreolus capreolus*) (Naranjo *et al.*, 2006; De la Fuente *et al.*, 2008).

Por otro lado, apenas existen estudios y pruebas concluyentes sobre la posible transmisión vertical de *A. ovis*, ya que la mayoría de los estudios realizados se centran en la anaplasmosis bovina. Estos estudios indican que, tanto en infecciones crónicas como agudas, se puede producir la transmisión transplacentaria de *A. marginale* en animales que se encuentren en el segundo o tercer tercio de la gestación. Esta transmisión se produce durante la fase extraeritrocitaria, es decir, cuando la bacteria se libera de un eritrocito para infectar a otro. Además, también se plantea que la inmunosupresión transitoria de las hembras en el parto pueda ser la razón del incremento de las infecciones subclínicas y, posiblemente, la causa de la

transmisión vertical de la bacteria (Lopo *et al.*, 2016; Gómez, 2016). Recientemente, se han llevado a cabo estudios sobre la transmisión vertical en ovino aunque esta no ha podido ser demostrada (Jiménez *et al.*, 2019).

El cambio climático también posee un papel impulsor en la aparición y transmisión de enfermedades mediadas por vectores. Los cambios en el clima incluyen el aumento de las temperaturas, particularmente en latitudes más altas; cambios en las precipitaciones, afectando a algunas áreas más propensas a las sequías; y eventos climáticos extremos, como es el caso de tormentas severas, eventos de calor extremo y rachas de fuertes lluvias. Estos cambios climáticos pueden impulsar la aparición y reaparición de enfermedades transmitidas por vectores mediante diversos mecanismos. En primer lugar, se produce la propagación de la infección a medida que el clima se calienta en zonas templadas y se vuelve más adecuado para las especies que actúan como vector. Por otro lado, se produce con mayor probabilidad y frecuencia la introducción y establecimiento endémico de enfermedades transmitidas por vectores tropicales y subtropicales en las regiones actualmente templadas mediante una combinación del aumento de temperaturas, acompañada del aumento en abundancia de vectores y patógenos. Por último, la aparición y la fijación de genotipos y cepas novedosas de patógenos transmitidos por vectores pueden ser resultado de los cambios provocados por el cambio climático en la dinámica del vector y el huésped animal (Ogden y Lindsay, 2016).

Los vectores poseen un rango de temperatura óptimo para su supervivencia y su alimentación. La temperatura creciente provoca un desarrollo más rápido, un ciclo de vida más corto, periodos de mayor actividad (en rangos de temperatura baja a media), periodos de actividad reducida (temperatura media a alta), aunque también puede provocar un aumento de la mortalidad a temperaturas extremadamente altas. El aumento de la humedad, a su vez, induce a un aumento de la actividad con efecto indirecto sobre la reducción de la mortalidad, mientras que la lluvia creciente inhibe la actividad de los vectores. El aumento de las temperaturas también provoca un aumento en el rango de animales y huéspedes reservorios (Ogden y Lindsay, 2016; Bouchard *et al.*, 2019).

El aumento de las temperaturas aumenta la supervivencia y el período de actividad de las garrapatas, aumenta el rango de los reservorios y los hospedadores de garrapatas (como es el caso de los ciervos o de los rumiantes silvestres) y aumenta la duración de la temporada cuando las personas pueden estar expuestas a las garrapatas. Los principales grupos de riesgo son las personas que se dedican a actividades recreativas u ocupacionales al aire libre, como por

ejemplo caza, senderismo o recolección en áreas endémicas o cerca de ellas; las personas cuya residencia primaria o secundaria se encuentra en/cerca de áreas endémicas; y las personas jóvenes (de 5 a 9 años) o mayores (de 55 años en adelante) (Bouchard *et al.*, 2019).

Los cambios en la virulencia, patogenicidad, rango de huéspedes, prevalencia y transmisión, se asocian a la diversidad genética de las bacterias, que dan como resultado nuevas cepas (Cabezas-Cruz *et al.*, 2019).

4.2. Cuadro clínico

Normalmente, la infección por *A. ovis* cursa sin signos clínicos, o de forma moderadamente virulenta, en ovejas y cabras domésticas, aunque se han reportado procesos más graves en algunas especies ¿silvestres?, como es el caso del carnero de las Rocosas (*Ovis canadensis*, especie propia de Norteamérica) (Torina *et al.*, 2010; Gharbi *et al.*, 2015). *Anaplasma ovis* es el principal agente relacionado con la anaplasmosis ovina. Se considera menos patógeno que otras especies de *Anaplasma*, provocando, generalmente, infecciones subclínicas que cursan con fiebre ocasional (Cabezas-Cruz *et al.*, 2019). Los animales con este tipo de infección, es decir, subclínica, facilitan el mantenimiento y la dispersión de la enfermedad (Yang *et al.*, 2019).

Al igual que sucede con otros hemoparásitos, la intensidad de la infección depende del equilibrio entre el sistema inmune del animal y el patógeno, lo cual desencadena un resultado diferente con una continua variación en la epidemiología y en la prevalencia, viéndose exacerbada por algunos factores de riesgo (Gharbi *et al.*, 2015). Se ha demostrado que otras infecciones transmitidas por garrapatas, como la teileriosis o la babesiosis, pueden predisponer tanto a ovejas como a cabras a la infección por *A. ovis*, al igual que ocurre con los piroplasmas (Aktas y Özubek, 2018).

Una vez que el agente se introduce en la circulación sanguínea, los primeros cuerpos de *Anaplasma* penetran en los eritrocitos por invaginación de la membrana plasmática sin provocar ningún tipo de daño, formando una vacuola y multiplicándose por reproducción asexual, en concreto, por fisión binaria. El número de eritrocitos infectados disminuye a medida que la enfermedad adquiere un carácter crónico (Masake y Musoke, 2010; Ekhtaivan *et al.*, 2019).

La enfermedad se puede dividir en cuatro fases. La primera, o fase de incubación, comienza en el momento de la introducción del organismo en el animal susceptible tras la picadura de la garrapata, hasta el momento en el que se infectan el 1% de los eritrocitos. Suele durar entre uno a tres meses, y no se observa ningún tipo de signo clínico. En la segunda fase, o etapa de desarrollo, se produce la anemia y se manifiestan los principales signos clínicos. Esta fase dura entre cuatro y nueve días, hasta que aparecen los reticulocitos en la circulación sanguínea periférica. La tercera fase, o etapa convaleciente, marca la resolución de la anemia, con una gran variación en su duración. En la última etapa, también llamada etapa portadora, el animal permanece infectado, pero los cuerpos de *A. ovis* no se pueden detectar en la sangre periférica. Esta fase final puede durar indefinidamente.

La fase aguda de la enfermedad se caracteriza, aunque no siempre, por provocar debilidad, postración, anemia severa, fiebre, pérdida de peso, abortos, disminución en el rendimiento y en la producción de leche, palidez de las mucosas, y, en raras ocasiones tos, disnea, atonía ruminal y la muerte (Yasini *et al.*, 2012; Gharbi *et al.*, 2015; Jiménez, 2015; Battilani *et al.*, 2017). No obstante, *A. ovis* puede ser altamente prevalente sin asociarse con ninguna alteración de los parámetros fisiológicos (Tumwebaze *et al.*, 2020). Sin embargo, en esta fase aguda, no suele evidenciarse hemoglobinuria, hemoglobinemia ni ictericia, al contrario de lo que sucede en otras enfermedades transmitidas por garrapatas (Kocan *et al.*, 2010).

El signo clínico más característico de *Anaplasma ovis* lo constituye una marcada anemia que comienza siendo normocítica y normocrómica al inicio de la infección. Durante el desarrollo de la enfermedad y por el aumento del número de reticulocitos, el punteado basófilo, y la policromasia, la anemia evoluciona a macrocítica y normocrómica (Yasini *et al.*, 2012). Este tipo de anemia puede confundirse con otras similares producidas por distintos grupos de patógenos como *Fasciola*, *Haemonchus* o *Mycoplasma ovis*, por ello es de vital importancia la utilización de métodos diagnósticos adecuados (Gharbi *et al.*, 2015).

Tras haberse multiplicado por fisión binaria, la bacteria sale del eritrocito para infectar a nuevos glóbulos rojos. Este mecanismo no está determinado todavía, pero se considera que es no lítico. La destrucción de los eritrocitos y la consecuente anemia hemolítica que se produce en los animales infectados no está por tanto causada directamente por la bacteria, sino que es consecuencia de la respuesta inmune del hospedador (Bautista, 1996; Brown, 2012; Jiménez, 2019). La destrucción de eritrocitos no se aprecia hasta los 20 días, ya que depende del sistema

retículo-endotelial del hospedador, manifestándose cuando el número de células infectadas supera un valor determinado (Jiménez, 2019).

Los animales recuperados se convierten en portadores, es decir, se mantienen infectados de manera persistente y actúan como reservorios de infección para la transmisión mecánica y/o biológica del patógeno (Aktas y Özubek, 2018). Además, se desarrolla cierta susceptibilidad a padecer cualquier otro tipo de enfermedad (Yasini *et al.*, 2012).

En la necropsia, no se evidencia ningún tipo de lesión patognomónica, aunque sí que es posible apreciar lesiones sugestivas de la enfermedad. En los casos agudos, la sangre se presenta más fluida, además de que no coagula fácilmente. El bazo generalmente se observa agrandado, presentando la pulpa de color marrón rojizo, y con los folículos esplénicos alargados. El hígado, en ocasiones, presenta un mayor tamaño, con bordes redondeados, y puede aparecer de color amarillento en los casos que cursen con ictericia. Finalmente, la vesícula biliar suele evidenciarse distendida y llena de bilis y se puede apreciar dilatación cardíaca ocasional. Los hallazgos histológicos incluyen hiperplasia de la médula ósea, y hematopoyesis extramedular en el bazo.

4.3. Respuesta inmune

La infección por *Anaplasma* en los hospedadores vertebrados se inicia por la adhesión de la bacteria a la membrana plasmática de las células diana, mediada por unas proteínas de superficie presentes tanto en la membrana externa del patógeno actuando como antígenos de *A. ovis*, como en el hospedador actuando como receptores celulares, denominadas *msp* (Aktas y Özubek, 2018).

Los estudios realizados hasta la fecha, evidencian una reacción inmunitaria humoral en esta patología. Los cuerpos intraeritrocíticos iniciales provocan modificaciones, tanto estructurales como bioquímicas, en la membrana plasmática de los eritrocitos. Los eritrocitos modificados inducen la producción de auto-anticuerpos, que a su vez estimulan la eritrofagocitosis. Por otro lado, los linfocitos también producen anticuerpos activos frente a los antígenos de *Anaplasma*, diferenciándose 6 polipéptidos o antígenos de la membrana externa, que se denominan *msp1a*, *msp1b*, *msp2*, *msp3*, *msp4* y *msp5* (Masake y Musoke, 2010). Todas las bacterias de la familia *Anaplasmataceae* poseen este complejo diverso de proteínas distintas expuestas en la superficie, que se han caracterizado más extensamente en *A. marginale* y *A.*

phagocytophilum, mientras que para *A. ovis* los informes y estudios son más limitados (Battilani *et al.*, 2017).

Los mecanismos de acción de los anticuerpos pueden provocar la destrucción directa del microorganismo mediante la intervención del complemento, interferir con la unión y la penetración de los eritrocitos por los cuerpos iniciales, intervenir en el proceso de opsonificación mediada por los anticuerpos o en la citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (Masake y Musoke, 2010).

Como se ha mencionado anteriormente, la anemia hemolítica asociada a esta enfermedad no es consecuencia directa de la bacteria, si no de la respuesta inmune que provoca *Anaplasma ovis* en el organismo, que es tanto humoral como celular. En un inicio, los linfocitos T CD4+ producen el interferón gamma (IFN- γ), que es el encargado de iniciar la respuesta inmune producida por las IgG2 coordinadas con macrófagos activados. Las IgG2 provocan la opsonización de los eritrocitos, uniéndose a epítomos de las proteínas de membrana de la bacteria expresados en el eritrocito infectado. La intensidad de la respuesta celular se correlaciona con el desarrollo de inmunidad frente a la enfermedad, al contrario que la intensidad de la respuesta humoral, que tiene una pobre correlación con el desarrollo de inmunidad (Bautista, 1996; Jiménez, 2015). En conclusión, esta 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; Brown, 2012; Jiménez, 2019).

La información disponible sobre el desarrollo de la inmunidad frente a *A. ovis* es escasa, ya que sólo afecta prácticamente a la especie ovina, que posee un escaso valor económico. En este sentido, recientemente se ha demostrado una respuesta inmune humoral en ovejas infectadas experimentalmente con *A. ovis* y la transferencia de inmunidad pasiva a sus corderos a través del calostro (Jimenez *et al.*, 2019).

Para otras especies de *Anaplasma*, como es el caso de *A. marginale* y *A. phagocytophilum*, que también pueden afectar al ganado ovino, se ha comprobado que la respuesta inmune que se desencadena es compleja, puesto que las bacterias han desarrollado mecanismos para evadir la respuesta inmune tanto innata como adaptativa. Además, se ha evidenciado una fuerte inmunosupresión que afecta a granulocitos y linfocitos, favoreciendo la aparición de procesos secundarios. Los hechos expuestos anteriormente plantean problemática

a la hora del desarrollo de vacunas, aunque 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 (Brown, 2012; Palacios, 2014).

4.4. Diagnóstico

Es frecuente que esta enfermedad sea infradiagnosticada, principalmente debido a la ausencia de síntomas específicos y, en consecuencia, es frecuente su confusión con otras patologías similares que cursen con el mismo cuadro clínico (Gharbi *et al.*, 2015). El diagnóstico de la anaplasmosis generalmente se basaba en el examen microscópico de un frotis sanguíneo teñido mediante el procedimiento de Giemsa. Actualmente, se realizan procedimientos serológicos y de diagnóstico molecular, no obstante, en las zonas donde hay antecedentes de anaplasmosis diagnosticados, es posible aproximar un diagnóstico clínico, aunque será necesaria una confirmación laboratorial (Kocan *et al.*, 2010; Yasini *et al.*, 2012; Shabana *et al.*, 2018).

Durante la fase aguda de la enfermedad, el diagnóstico a nivel individual se realiza generalmente en función de los signos clínicos, la presencia del patógeno en el frotis sanguíneo y la evidencia de la anemia. No obstante, al ser el examen microscópico el método diagnóstico rutinario, no es aplicable para la detección de casos pre-sintomáticos o portadores debido al bajo número de células infectadas con *Anaplasma* en circulación, de igual manera que ocurre con los casos crónicos, pues no tiene sensibilidad suficiente como para detectar la infección (Yasini *et al.*, 2012; Shabana *et al.*, 2018).

La infección se hace visible al microscopio a las 2-6 semanas desde la transmisión. La detección en el frotis sanguíneo utilizando la tinción Giemsa no refleja la situación real en la epidemiología de *A. ovis*, ya que es un método con poca sensibilidad, que requiere de gran experiencia y práctica, además de que se infectan un bajo número de células y a la aparición de artefactos intracelulares (Renneker *et al.*, 2013; Shabana *et al.*, 2018). Se considera un método diagnóstico obsoleto.

El diagnóstico microscópico, puede ser difícil en animales portadores, por lo tanto, se han utilizado varias técnicas serológicas para la detección de anticuerpos específicos de *Anaplasma*, como la inmunofluorescencia indirecta (IFA), el ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) y las pruebas de fijación del complemento. El ELISA competitivo (cELISA)

utiliza un anticuerpo monoclonal ANAF16C1 que reconoce el antígeno conservado *msp5* de diferentes *Anaplasma sp.*, por lo que es posible emplear kits comerciales para una especie en otra, aunque no es posible con estas técnicas distinguir si la enfermedad está siendo provocada por *A. marginale* o *A. ovis* (Hornok *et al.*, 2007; Shabana *et al.*, 2018).

La diversidad genética de *A. ovis* ha sido caracterizada basándose en el gen principal de la proteína de superficie *msp4* de distintas cepas aisladas en diferentes hospedadores y ubicaciones geográficas (De la Fuente *et al.*, 2008). Actualmente, la identificación y caracterización del agente responsable de la anaplasmosis ovina se basa principalmente en el análisis de los genes 16S rRNA y de esta proteína *msp4*. Sin embargo, el problema radica en que estos genes presentan varias similitudes y se mantienen altamente conservados entre cepas heterólogas, por lo que no es efectivo a la hora de discriminar entre distintas cepas (Han *et al.*, 2017; Aktas y Özubek, 2018).

Las pruebas serológicas, como es el caso de ELISA, conllevan riesgo de reactividad cruzada con patógenos estrechamente relacionados, como es el caso de la detección de anticuerpos contra el antígeno de *A. marginale*, que da lugar a una reacción cruzada con *A. ovis*. Además, en la fase aguda temprana de la infección, los ensayos serológicos tienen un valor limitado, debido a la ausencia de anticuerpos detectables (Renneker *et al.*, 2013; Shabana *et al.*, 2018). Los test serológicos no discriminan entre las diferentes especies de *Anaplasma* debido a su similitud antigénica.

El progreso en la biología molecular, incluyendo la PCR (polymerase chain reaction o reacción en cadena de la polimerasa) y la secuenciación, ha mejorado en gran medida la detección de patógenos, tanto a nivel de sensibilidad como de especificidad. Desde el establecimiento de una PCR específica para la detección del ADN de *A. ovis*, se han generado nuevos datos con respecto a su persistencia endémica (Renneker *et al.*, 2013). Estos métodos de identificación molecular tienen varias ventajas en comparación con las pruebas anteriores, considerándose la PCR la herramienta de diagnóstico más sensible y fiable. Esta técnica permite discriminar entre las subespecies de *Anaplasma*, así como identificar las infecciones con múltiples subespecies de la misma, y detectar infecciones con un mínimo de 0,0001% de eritrocitos infectados (Shabana *et al.*, 2018).

Para el diagnóstico molecular se han descrito varios ensayos de PCR y PCR en tiempo real para identificar especies de *Anaplasma*. Sin embargo, aquellos que tienen como objetivo la

proteína de superficie *msp4* son los considerados como herramientas confiables para la identificación y diferenciación de estos microorganismos (Noaman y Bastani, 2016).

No obstante, la co-infección de diferentes especies de *Anaplasma* puede aumentar las dificultades en el diagnóstico de la anaplasmosis ovina con cualquier método (Yang *et al.*, 2019).

4.5. Tratamiento

En la actualidad, una actividad clave abordada por parte de la sanidad pública es la vigilancia y detección de garrapatas, la notificación de los casos humanos y el mantenimiento de información precisa sobre el riesgo general de exposición humana a las garrapatas y a sus patógenos. Otras propuestas son la identificación y delimitación geográfica, la educación preventiva a la población, el conocimiento de las estrategias de riesgo y las medidas de prevención dirigidas a las personas con alto riesgo de exposición (Bouchard *et al.*, 2019).

En la mayoría de los casos, la protección de las ovejas y las cabras frente a *Anaplasma ovis* se basa en estrategias para prevenir la infestación con garrapatas, es decir, todavía depende principalmente de la aplicación directa de acaricidas a los animales. El tratamiento debe programarse para proteger a los animales durante el pico de mayor actividad de las garrapatas (Hurtado y Giraldo-Ríos, 2018).

Las estrategias de control contra las garrapatas deben estar dirigidas a cortar su ciclo biológico. Existe una gran cantidad de opciones útiles para el control de las mismas por medio de productos químicos, pero, aún así, es difícil lograr un control duradero, por lo que se sugiere considerar y seguir un enfoque integrado (Hurtado y Giraldo-Ríos, 2018).

En pequeñas unidades de pastoreo, las garrapatas pueden eliminarse manualmente de los animales. Por otro lado, se puede optar por la quema de pastos muy infestados, aunque no se recomienda ampliamente debido a sus efectos dañinos para el medio ambiente. La labranza de las tierras de pastoreo expone los diferentes estadios de las garrapatas que se encuentran en el suelo a la luz solar, y también las entierra en capas profundas del suelo, evitando su desarrollo (Hurtado y Giraldo-Ríos, 2018).

El tratamiento quimioterápico de los animales afectados ha presentado escaso efecto, como por ejemplo, la utilización de dipropionato de imidocarb o de tetraciclinas. No obstante, estudios recientes han obtenido resultados variables: desde la eliminación de la infección hasta una mejora en la sintomatología, como es el caso de la doxiciclina durante periodos largos en el tratamiento de la anaplasmosis ovina (Fanlo, 2015); clortetraciclina oral durante 80 días para eliminar el estado de portador (Reinbold *et al.*, 2010), o enrofloxacin mediante inyecciones durante 6 días para mejorar la sintomatología (Coetzee, 2006). Como se ha indicado anteriormente, el tratamiento con doxiciclina es efectivo, pero poco práctico, ya que la aplicación diaria inyectable resulta poco práctica para el ganadero (Fanlo, 2015).

Aunque el tratamiento no sea altamente efectivo, los estudios recientes han permitido comprender mejor el comportamiento evolutivo de *Anaplasma sp.* y la interacción huésped-patógeno, y, aunque aún se necesitan más investigaciones para dilucidar la importancia epidemiológica de *Anaplasma*, cada vez se busca en mayor medida desarrollar estrategias más eficaces de control y prevención (Battilani *et al.*, 2017).

EL SCRUM Y LA ANAPLASMOSIS OVINA

En el año 2014, se comenzó a desarrollar un estudio por parte del Servicio Clínico de Rumiantes de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza (SCRUM) en rebaños de la Comarca de Matarraña (Teruel). Los animales afectados presentaban un cuadro caracterizado por su inespecificidad: pérdida de peso, debilidad, palidez de mucosas, conjuntivitis, abortos y cojeras, con una prevalencia de entre el 2-5% en los rebaños de la comarca y con una morbilidad de entre el 50-60% en la población de animales de entre 1 y 3 años. A pesar de no producir una elevada mortalidad, se produjeron grandes pérdidas productivas, dando lugar a que los animales tuvieran que ser desechados por los ganaderos.

Tres ovejas de la raza Rasa Aragonesa de entre 10 y 11 meses, pertenecientes a estos rebaños, fueron remitidas al SCRUM. Estas presentaban un cuadro de debilidad extrema, anorexia, y pérdida crónica de peso. Para intentar realizar el diagnóstico de estos animales fueron sometidos a numerosas pruebas clínicas complementarias, como cultivos microbiológicos, PCR (qPCR, a tiempo real) y sangre entera para realizar análisis hematológicos y suero. Sin embargo, los primeros resultados no fueron concluyentes.

Por otro lado, las hematologías evidenciaron una fuerte anemia normocítica y normocrómica que evolucionó a lo largo de los dos meses de estudio, mientras que, en las pruebas bioquímicas, las enzimas AST (indicadora de daño hepático) y GGT (indicadora de colestasis) se encontraban elevadas. Los hallazgos clave fueron la hemoglobinuria, la bilirrubinuria y la proteinuria, indicadores de un cuadro de anemia hemolítica. Finalmente, las PCR confirmaron que el agente responsable era *Anaplasma ovis*.

Debido al diagnóstico de este caso clínico y al aumento del número de casos remitidos al SCRUM de distintos territorios de la península, se propuso la realización de diversos estudios con el fin de aumentar los conocimientos sobre la enfermedad: un estudio epidemiológico de la comarca afectada, la infección experimental de unas corderas libres de la enfermedad y un ensayo clínico de tratamiento con doxiciclina con diferentes pautas terapéuticas, además de estudiar la respuesta inmunológica del hospedador, así como la determinación de la posible transmisión vertical de la bacteria y la transferencia de inmunidad de la madre a los corderos a través del calostro. Los estudios se realizaron durante 2 ciclos productivos completos, incluyendo gestación, parto y lactancia, y, actualmente, se sigue trabajando en ello.

Tras la infección experimental, los animales desarrollaron anticuerpos frente a *A. ovis* en torno a los 10 días y mostraron signos clínicos a partir de una semana post-infección, con un decaimiento general del estado, fiebre durante los primeros dos días y a los siete días, aunque se asoció más bien al estrés generado mediante la cirugía del corte de colas para someter a los animales a un factor estresante y al manejo. Se produjeron episodios febriles durante los dos meses que duró el seguimiento, pero ninguno altamente marcado, con una media de 40^o-41^oC. Los anticuerpos se mantuvieron aproximadamente durante 10 meses.

La anemia fue variable, y acabó siendo superada de forma natural por el animal por la intensa respuesta regenerativa. Esto se debe a que los animales infectados, mantenidos en buenas condiciones de bienestar y alimentación, fueron capaces de superar la infección por ellos mismos de manera natural. No obstante, en reinfecciones sucesivas, se evidenció que el organismo no reacciona de una manera tan exagerada y no se llega a producir esa grave anemia hemolítica.

Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, no existía ningún estudio sobre la transmisión vertical de *A. ovis*, por lo que otra línea de investigación fue el estudio de esta posible vía de transmisión. Se realizaron tomas de sangre entera de las ovejas y de sus corderos

para detectar *A. ovis* mediante qPCR y se buscaron anticuerpos frente a la misma mediante cELISA tanto en suero de ovejas, corderos, como en calostros. No se evidenció la transmisión vertical, aunque no se puede afirmar rotundamente que dicha vía no sea posible, puesto que solamente se estudiaron tres ovejas con sus diferentes crías en tres ciclos productivos completos, aunque sí que se confirmó la transferencia de anticuerpos de la madre a los corderos a través del calostro, y, de igual manera, se detectó la presencia de anticuerpos en el calostro de las ovejas objeto de estudio y en la sangre de los corderos tras la ingestión del calostro.

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas tras la realización del presente Trabajo de Fin de Grado son las siguientes:

1. La anaplasmosis ovina es una enfermedad que suele cursar de manera subclínica, o con un cuadro clínico muy inespecífico en ovino, por lo que muchas veces no se evidencian sus consecuencias, provocando pérdidas económicas enmascaradas.
2. La anemia, que es el signo clínico característico, no es provocada directamente por la bacteria, si no que es resultado de una respuesta inmune del organismo tanto humoral como celular.
3. El cambio climático afecta a la diseminación de esta patología. Las altas temperaturas afectan sobre todo al ciclo vital de las garrapatas y a la interacción entre el parásito, los reservorios y los hospedadores, habiéndose producido un aumento de los casos totales en los últimos años.
4. La existencia de distintos géneros y cepas dificulta el diagnóstico de la anaplasmosis ovina. La utilización del microscopio óptico se puede considerar obsoleta, por lo que actualmente se utilizan métodos serológicos y moleculares, aunque pueden presentar errores y aumentar el precio de los servicios clínicos.
5. El escaso interés económico del ganado ovino en los países desarrollados, al contrario de lo que sucede en los países en vía de desarrollo, en los que gran parte de

la economía gira en torno a la producción del ovino, es el responsable de la limitada información disponible sobre la enfermedad en esta especie. Por ello, es de vital importancia el desarrollo de estudios para investigar en profundidad la anaplasmosis en el ganado ovino.

CONCLUSIONS

The conclusions obtained after the completion of this Final Degree Paper are the following:

1. Ovine anaplasmosis is a disease usually occurring subclinically, or with a very non-specific clinical picture in sheep, so that its consequences are often not evident, causing masked economic losses.
2. Anaemia, which is the characteristic clinical sign, is not directly caused by bacteria, but is the result of an immune response from both the humoral and cellular immune system.
3. Climate change affects the spread of this disease. The high temperatures influence especially the life cycle of ticks and the interaction between the parasite, the reservoirs and the hosts, having produced an increase of the total cases in the last years.
4. The existence of different genera and strains makes it difficult to diagnose ovine anaplasmosis. The use of the optical microscope can be considered obsolete, so currently serological and molecular methods are used, although they can present errors and increase the price of clinical services.
5. The lack of interest in sheep in developed countries results in the absence of studies, as in the case of *A. ovis*, unlike in developing countries, where much of the economy revolves around sheep production. Therefore, it is of vital importance to develop studies to know the disease in depth.

VALORACIÓN PERSONAL

A pesar de no ser esta la temática inicial de mi Trabajo de Fin de Grado, he de reconocer que me ha sorprendido gratamente. En un comienzo, iba a ser de modalidad experimental, relacionado de igual manera con la anaplasmosis ovina y del traspaso de la inmunidad mediante el calostro, pero, por la situación actual del COVID-19, no se pudo realizar.

La realización de este trabajo me ha ayudado a entender y comprender esta enfermedad, puesto que apenas ha sido estudiada en el ganado ovino, y a asentar unos conocimientos relacionados con el tratamiento y la gestión de las patologías poco conocidas y estudiadas. Pero eso no es todo: lo más interesante, para mi punto de vista, ha sido profundizar en los factores ajenos a la enfermedad, destacando el interés científico-económico de algunos países y la influencia del clima en la evolución de la infección.

Por último, la pequeña cantidad de artículos académicos relacionados con el tema que he manejado me ha ayudado a saber elegir la metodología adecuada a la hora de conseguir información para realizar el estudio bibliográfico, pues, al fin y al cabo, para desarrollar un tema del que apenas hay revisiones hay que equivocarse y tener paciencia.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer fuertemente y de todo corazón a todas las personas que hay detrás de este trabajo. En primer lugar, a mis tutoras, Delia y Aurora, por haberme apoyado con el tema y por haber puesto siempre los medios necesarios para haberlo hecho posible. Además, me gustaría enviar millones de gracias a mis compañeros (familia) del SCRUM, por haberme dado ese empujoncillo que en ocasiones necesitaba y por haber echado una mano siempre que han podido. Por último, agradecer el apoyo incondicional de mis amigos, tanto de la universidad como de Binéfar, y a mi familia, por supuesto, que siempre han estado ahí.

BIBLIOGRAFÍA

- Aktas, M., Özübek, S., (2018). *Anaplasma ovis* genetic diversity detected by major surface protein 1a and its prevalence in small ruminants. *Veterinary Microbiology*, Volume 217, April 2018, Pages 13-17.
- Anda, P., Blanco, J. R., Jado, I., Marín, M., Oteo, J. A., Pons, I., Portillo, A., Sanfeliu., (2007). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: Diagnóstico microbiológico de las infecciones por patógenos bacterianos emergentes: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Tropheryma whipplei*. EIMC, capítulo 27.
- Battilani, M., de Arcangeli, S., Balboni, A., Dondi, F., (2017). Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. *Infection, Genetics and Evolution*, Volume 49, April 2017, Pages 195-211.
- Bautista, G., (1996). La respuesta inmune celular en anaplasmosis bovina. *Ciencia Veterinaria*, 7(24), 315–329.
- Bouchard, C., Dibernardo, A., Koffi, J., Wood, H., Leighton, P. A., Lindsay, L. R., (2019). An Increased risk of tick-borne diseases with climate and environmental changes. *Canada Communicable Disease Report*. 2019 Apr 4; 45(4): 83–89.
- 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.
- Bevan, L. E. W., (1912). Anaplasmosis of sheep. *Veterinary journal*. 68, 400- 401.
- Cabezas-Cruz, A., Gallois, M., Fontugne, M., Allain, E., Denoual, M., Moutaillier, S., Devillers, E., Zientara, S., Memmi, M., Chauvin, A., Agoulon, A., Vayssier-Taussat, M., Chartier, C., (2019) Epidemiology and genetic diversity of *Anaplasma ovis* in goats in Corsica, France. *Parasites and Vectors* 12, Article number: 3 (2019).
- Chochlakakis, D., Ioannou, I., Tselentis, Y., Psaroulaki, A., (2010). Human Anaplasmosis and *Anaplasma ovis* Variant. *Emerg Infect Dis*. 2010 Jun; 16(6): 1031–1032.
- Coetzee, J. F.; Apley, M. D., (2006). Efficacy of enrofloxacin against severe experimental *Anaplasma marginale* infections in splenectomized calves. *Therapeutics* Vol. 7, No 4, Winter 2006.
- Doudier, B., Olano, J., Parola, P., Brouqui., (2010). Factors contributing to emergence of Ehrlichia and *Anaplasma* spp. as human pathogens. *Veterinary Parasitology*. 2010 Feb 20; 167 (2-4): 149-54.
- Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F., (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with *Anaplasma*, *Cowdria* with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2001), 51, 2145–2165.

- Enkhtaivan, B., Narantsatsral, S., Davaasuren, B., Otgonsuren, D., Amgalabaatar, T., Uuganbayar, E., Zoljargal, M., Myagmarsuren, P., Sukanuma, K., Molefe, N. I., Sivakumar, T., Inoue, N., Battur, B., Battsetseg, B., Yokoyama, N., (2019). Molecular detection of *Anaplasma ovis* in small ruminants and ixodid ticks from Mongolia. *Parasitology international* (2019) Vol. 69, pags 47-53.
- Estrada-Peña, A., (2015). Orden Ixodida: Las garrapatas. IDE@ - SEA (2015): pags 1-15.
- Fanlo, T., (2005). Estudios sobre la anaplasmosis ovina en la comarca del Matarraña (Teruel). Trabajo Fin de Grado. Facultad de Veterinaria de Zaragoza.
- De la Fuente, J., (2008). Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. *Veterinary Science* 84(3):382-386.
- Friedhoff, K. T., (1997). Tick-borne diseases of sheep and goats caused by Babesia, Theileria or Anaplasma spp. *Parassitologia*. 1997 Jun;39(2):99-109.
- Gharbi, M., Omri, H., Jedidi, M., Zorii, S., Darghouth, M. A., (2015). Epidemiological study of sheep anaplasmosis (*Anaplasma ovis* infection) in Kairouan, Central Tunisia. *The Journal of Advances in Parasitology*. 2(2): 30-33.
- Gómez, M., (2016). Anaplasmosis ovina: transmisión vertical e inmunidad calostrual. Trabajo Fin de Grado. Facultad de Veterinaria de Zaragoza.
- Han, R., Yang, J., Liu, Z., Gao, S., Niu, Q., Hassan, M. A., Luo, J., Yin, H., (2017). Characterization of *Anaplasma ovis* strains using the major Surface protein 1a repeat sequences. *Parasites and Vector* 10, Article 447, 2017.
- Hashemi-Fesharki, R., (1997). Tick-borne diseases of sheep and goats and their related vectors in Iran. *Parassitologia* 39, 115–117.
- 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.
- Hurtado, O. J., Giraldo-Ríos, C., (2018). Economic and Health Impact of the Ticks in Production Animals. *Ticks and Tick-Borne Pathogens*. Intechopen.
- Jiménez, 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.
- Jiménez, C., Benito, A., Arnal, J. L., Ortín, A., Gómez, M., López, A., Villanueva-Saz, S., Lacasta, D., (2019). *Anaplasma ovis* in sheep: experimental infection, vertical transmission and colostral immunity. *Small Ruminant Research* 178 (2019) 7-14.
- Keirans, J. E., Robbins, R. G., (1992). Systematics and ecology of the subgenus Ixodiopsis (Acari: Ixodidae: Ixodes). Volume 14, Thomas Say Foundation, Entomological Society of America, Lanham, MD. viii + 159 pp.
- Kocan, K.M., Stiller, D., Goff, W.L., Claypool, P.L., Edwards, W., Ewing, S.A., McGuire, T.C., Hair, J.A., Barron, S.J., (1992). Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from infected to susceptible cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 5, 499–507.

- Kocan K.M., De la Fuente J., Blouin E.F., Garcia-Garcia J.C., (2004): *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne Rickettsia. *Parasitology*, 129, 285–300.
- Kocan, K. M., De la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., Ewing, S. A., (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 167(2-4), 95–107.
- Liu, Z., Peasley, A. M., Yang, J., Li, Y., Guan, G., Luo, J., Yin, H., Brayton, K. A., (2019). The *Anaplasma ovis* genome reveals a high proportion of pseudogenes. *BMC Genomics*. 2019; 20: 69.
- 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.
- Masake, R., Musoke, A., (2010). Blood Parasitic Diseases and Specific Immune Responses. International Livestock Research Institute (ILRI). OIE, 43-55.
- Noaman, V., Bastani, D., (2016). Molecular study on infection rates of *Anaplasma ovis* and *Anaplasma marginale* in sheep and cattle in West-Azerbaijan province, Iran. *Vet. Res. Forum* 7 (2), 163–167.
- Ogden, N. H., Lindsay, L. R., (2016). Effects of Climate and Climate Change on Vectors and Vector-Borne Diseases: Ticks are Different. *Trends in Parasitology*, Volume 32, Issue 8, August 2016, Pages 646-656.
- Olguín y Bernal, A., (2004). Anaplasmosis. Universidad Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Palacios, C., Torioni, S., Mattion, N., (2014). Evaluation of the immune response to *Anaplasma marginale* MSP5 protein using a HSV-1 amplicon vector system of recombinant protein. *Research in Veterinary Science*, 97, Pages 514-520.
- Rar, V., Golovljova, I., (2011). *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus Neoehrlichia*” bacteria: Pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(8), 1842–1861.
- Reinbold, J. B., Coetzee, J. F., Hollis, L. C., Nickell, J. S., Riegel, C., Olson, K. C., Ganta, R. R., (2010). The efficacy of three chlortetracycline regimens in the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infection. *Veterinary Microbiology* 145 (2010) 69-75.
- Renneker, S., Abdo, J., Salih, D. E. a, Karagenc, T., Bilgiç, H., Torina, A., Seitzer, U., (2013). Can *Anaplasma ovis* in Small Ruminants be Neglected any Longer? *Transboundary and Emerging Diseases*, 60(SUPPL.2), 105–112.
- Rymaszewska, A., & Grenda, S., (2008). Bacteria of the genus *Anaplasma*—characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. *Veterinary Medicine*, 53(11), 573–584.
- Shabana, I. I., Alhadlag, N. M., Zaraket, H., (2018). Diagnostic tools of caprine and ovine anaplasmosis: a direct comparative study. *BMC Veterinary Research*. 2018; 14: 165.

- De Silva, A. M., E. Fikrig., (1997). Arthropod- and host-specific gene expression by *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Investigation*. 99, 377–379.
- Stuen, S., (2016). Haemoparasites in small ruminants in European countries: challenges and clinical relevance. *Small Ruminant Research*. 142, 22–27.
- Torina, A., Caracappa, S., (2012). Tick-borne diseases in sheep and goats: Clinical and diagnostic aspects. *Small Ruminant Research*, 106(SUPPL.), S6–S11.
- 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* (2010) 42:1327-1331.
- Tumwebaze, M. A., Lee, S., Moumoni, P. F. A., Mohammed-Geba, K., Sheir, S. K., Galal-Khallaf, A., Abd El Latif, H. M., Morsi, D. S., Bishr, Nora. M., May Galon, E., Byamukama, B., Liu, M., Li, J., Li, Y., Ji, S., Ringo, A. E., Abdo Rizk, M., Suzuki, H., Ibrahim, H. M., Xuan, X., (2020). First detection of *Anaplasma ovis* in sheep and *Anaplasma platys*-like variants from cattle in Menoufia governate, Egypt. *Parasitology International*, Volume 78, October 2020.
- Urán, J., Cardona Arias, J. A., (2019). Prevalencia de *Anaplasma* spp. En el ámbito mundial: Revisión sistemática 1978-2018. *Hechos Microbiológicos*. 2019; 10 (1-2):30-38.
- Walker, J., Keirans, J., Horak, I., (2005) *The Genus Rhipicephalus (Acari, Ixodidae) A Guide to the Brown Ticks of the World*. Cambridge University Press.
- Yang, J., Han, R., Niu, Q., Liu, Z., Guan, G., Liu, G., Luo, J., Yin, H., (2018). Occurrence of four *Anaplasma* species with veterinary and public health significance in sheep, northwestern China. *Ticks and Tick-borne Diseases*, Volume 9, Issue 1, January 2018, pages 82-85.
- 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.