

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Detección molecular de agentes causantes de enfermedades transmitidas por garrapatas en ganaderías de Eslovaquia y España

Detección molecular de axentes causantes de enfermedades transmitidas por carrachas en ganderías de Eslovaquia e España

Molecular detection of the causative agents of tick-borne diseases in cattle ranches in Slovakia and Spain

Molekulárna detekcia pôvodcov kliešťom prenášaných ochorení u dobytku zo Slovenska a Španielska

Dominika Marušáková

28 de junio, 2018

*Director Académico: Dr. Andrés Martínez Lage
Codirector: RNDr. Bronislava Víchová, PhD.*



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Departamento Biología Celular y Molecular – Área de Genética

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Dr. Andrés Martínez Lage autoriza la presentación do trabajo de fin de grado **“Detección molecular de agentes causantes de enfermedades transmitidas por garrapatas en ganaderías de Eslovaquia y España”** presentado por **Dominika Marušáková** para su evaluación frente al tribunal calificador.

En A Coruña, a 28 de junio de 2018

Firmado el director del trabajo:

Dr. Andrés Martínez Lage

ÍNDICE

Resumen / Summary / Zhrnutie	7
Palabras clave / Keywords / Klíčové slová	8
1. Introducción	9
1.1. La garrapata como vehículo de infección	9
1.2. Patógenos transmitidos por la garrapata	10
2. Objetivos	13
3. Material y métodos	14
3.1. Áreas de estudio	14
3.2. Análisis de ADN	14
4. Resultados	16
5. Discusión	19
6. Conclusiones / Conclusions / Závěry	23
7. Bibliografía	24

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por garrapatas (Ixodidae) son globalmente importantes, porque representan un riesgo para los animales domésticos y salvajes. El ganado se ve afectado por este tipo de enfermedades, ya que se encuentra libremente en los sitios con buena vegetación, lo que predetermina su papel de hospedadores para las garrapatas como vectores de enfermedades producidas por parásitos intracelulares.

Nuestro estudio no confirma los conocimientos previos de que hay prevalencia de las enfermedades *Anaplasma phagocytophilum* y *Babesia spp.* en el ganado, esto se puede deber al número reducido de muestras analizadas. La distribución y número de garrapatas está afectado por varios factores bióticos y abióticos, entre ellos destacamos el factor climático, ya que el clima en los países de interés se ha cambiado en los últimos años.

La muestra positiva a *Theileria annulata* o *Theileria orientalis* procede de la ganadería en Vranov nad Topľou (Eslovaquia). La enfermedad teileriasis producida por estos patógenos es transmitida por garrapatas. La vaca infectada no presentaba ninguno de los síntomas de la enfermedad, lo que se debe a que los animales fuertes y sanos pueden presentar la enfermedad crónica sin demostrar los síntomas típicos. Por esto, la enfermedad se puede transmitir a otros animales de una población por las garrapatas sin saberlo. La enfermedad, si presenta un riesgo para los animales débiles, estresados o con inmunidad baja y puede producir así la epidemia de enfermedad o pérdidas económicas debido a las muertes innecesarias.

El estudio quiere señalar la importancia de controlar las enfermedades transmitidas por garrapatas y las garrapatas en el medio ambiente que presentan una amenaza para los animales, pero también para el ser humano.

SUMMARY

The diseases transmitted by ticks (Ixodidae) are globally important because they represent a risk for domestic and wild animals. Livestock is affected by this type of diseases, since it is found freely in sites with good vegetation, which predetermines its role as hosts for ticks as vectors of diseases produced by intracellular parasites.

Our study does not confirm previous knowledge that there is a prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia spp.* in cattle, which may be due to the reduced number of samples analyzed. The distribution and number of ticks are affected by several biotic and abiotic factors, among them we highlight the climatic factor, since the climate in the countries of interest has changed in recent years.

The positive sample of *Theileria annulata* or *Theileria orientalis* comes from livestock in Vranov nad Topľou (Slovakia). The disease theileriasis produced by these pathogens is transmitted by ticks. The infected cow did not show any of the symptoms of the disease, which is due to the fact that strong and healthy animals can present the chronic disease without demonstrating the typical symptoms. Because of this, the disease can be transmitted to other animals in a population by ticks without knowing it. The disease does present a risk for weak, stressed or low immunity animals and thus produce epidemic of disease or economic losses due to unnecessary deaths.

The study wants to point out the importance of controlling the diseases transmitted by ticks and ticks in the environment that pose a threat to animals, but also to humans.

ZHRNUTIE

Choroby prenášané kliešťami (Ixodidae) sú celosvetovo dôležité, pretože predstavujú riziko pre domáce a voľne žijúce zvieratá. Dobytok je postihnutý týmito ochoreniami, pretože sa nachádza voľne na miestach s dobrou vegetáciou, ktorá predurčuje ich úlohu byť hosťiteľmi kliešťov ako vektorov chorôb spôsobených intracelulárnymi parazitmi.

Naša štúdia nepotvrďuje predchádzajúce vedomosti, že prevláda infekcia s *Anaplasma phagocytophilum* a *Babesia spp.* u hovädzieho dobytku, čo môže byť spôsobené nízkym počtom analyzovaných vzoriek. Distribúcia a počet kliešťov ovplyvňujú viaceré biotické a abiotické faktory, medzi ktorými upozorňujeme na klimatický faktor, pretože v posledných rokoch došlo k zmene podnebia v týchto krajinách.

Pozitívna vzorka *Theileria annulata* alebo *Theileria orientalis* pochádza z hospodárskych zvierat z Vranova nad Topľou (Slovensko). Ochorenie teileriáza produkované týmito patogénmi sa prenáša kliešťami. Infikovaná krava nevykazovala žiadny zo symptómov ochorenia, čo je spôsobené tým, že silné a zdravé zvieratá môžu byť chronicky nakazené bez toho, aby preukazovali typické príznaky. Z tohto dôvodu môže choroba prenášaná kliešťami na iné zvieratá v populácii ostať bez povšimnutia. Ochorenie predstavuje riziko pre zvieratá, ktoré sú slabé, stresované alebo majú zníženú imunitu, čo môže spôsobiť epidémiu chorôb alebo ekonomické straty v dôsledku zbytočných úmrtí zvierat.

Štúdia chce poukázať na dôležitosť kontroly chorôb prenášaných kliešťami a kliešťov vo voľnej prírode, ktoré predstavujú hrozbu pre zvieratá, ale aj pre ľudí.

PALABRAS CLAVE

Theileria annulata, *Theileria orientalis*, *Babesia spp.*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Bos taurus*, DNA, rDNA, Msp2

KEYWORDS

Theileria annulata, *Theileria orientalis*, *Babesia spp.*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Bos taurus*, DNA, rDNA, Msp2

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Theileria annulata, *Theileria orientalis*, *Babesia spp.*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Bos taurus*, DNA, rDNA, Msp2

1. INTRODUCCIÓN

La Limousine es una raza de *Bos Taurus* Linnaeus, 1758 que procede del Sur de Francia. La raza es de alta producción cárnica ya que es bastante musculosa, con carne de buena calidad y con escasa cobertura de grasa. Esto hace que su producción esté extendida globalmente por todo el mundo siendo en Europa la raza de producción cárnica más empleada.

En Eslovaquia, el número de vacas Limousine sigue una tendencia de empleo creciente, sin embargo, en Galicia no es tan común, ya que en esta comunidad autónoma predomina la raza Rubia Gallega y las ganaderías con Limousine son más bien escasas.

1.1. LA GARRAPATA COMO VEHÍCULO DE INFECCIÓN

Las garrapatas de la familia Ixodidae tienen un escutelo duro en la parte dorsal de su cuerpo, que es la característica que más fácilmente las hace identificables de otras especies parecidas.

La garrapata común (*Ixodes ricinus*, Acarina Ixodidae, Linnaeus, 1758) parasita a todo tipo de animales, incluido el hombre. Esta garrapata es una gran trasmisora de enfermedades. En la misma familia nos encontramos con otras especies también transmisoras de enfermedades como son *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794), *Haemaphysalis* spp., *Hyalomma* spp., entre otras.

Nos centraremos en *I. ricinus*, ya que es más abundante en Europa (principalmente en zonas de nuestro estudio) y es el transmisor típico de enfermedades. *I. ricinus* es endémica de Europa con la excepción de la región mediterránea y sus hábitats más comunes son prados, bosques caducifolios y mixtos y, en general, zonas con abundancia de hospedadores y sitios húmedos con vegetación bastante densa. Los hospedadores más comunes de *I. ricinus* son los rebaños debido a su alta densidad, lo que permite acumular grandes poblaciones de parásitos. Esto permite normalmente tener un número elevado de parásitos que facilita la propagación de enfermedades del grupo de las zoonosis, peligrosas ya que se pueden transmitir al ser humano.

El ciclo de vida de *I. ricinus* consta de tres hospedadores, que dura normalmente entre dos y cuatro años. A lo largo de él se alteran tres etapas de desarrollo - larva, ninfa y adulto, sólo presentando los adultos los sexos diferentes. En función del tamaño de desarrollo la garrapata se alimenta de la sangre de animales de diferente tamaño. Este fenómeno está relacionado con el distinto tamaño de los estadios de *I. ricinus*, ya que las larvas, que presentan 6 patas, se alimentan de sangre de pequeños animales (insectívoros, roedores, reptiles, pequeños mamíferos, etc.). Las ninfas que ya poseen 8 patas se alimentan chupando sangre de animales de pequeño o mediano tamaño. En este estadio la ninfa necesita alimentarse alrededor de una semana para poder metamorfosear al adulto, en el que se van a diferenciar los dos sexos. El dimorfismo sexual es muy significativo, ya que los machos no se alimentan o se alimentan limitadamente. Sin embargo, las hembras se alimentan de sangre de animales medianos o grandes incluyendo los humanos. La fecundación de la hembra por parte del macho se produce en el hospedador mientras que la hembra esté chupando la sangre. Después de una fecundación exitosa, la hembra pone entre 2000 y 5000 huevos y se morirá tras la desecación de su cuerpo (los huevos utilizan los nutrientes conseguidos del cuerpo de la madre).

1.2. PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR LA GARRAPATA

Los patógenos más importantes que transmiten las garrapatas de la especie *I. ricinus* son, sobre todo, *Anaplasma phagocytophilum* (Theiler, 1910) y *Babesia spp.* En un principio, la probabilidad de encontrar los patógenos mencionados es bastante alta en el ganado vacuno.

A. phagocytophilum es un parásito intracelular obligado perteneciente al orden Rickettsiales. Es un microorganismo intracelular gram negativo que parasita en los neutrófilos (granulocitos) de los hospedadores, produciendo la anemia hemolítica. Esta enfermedad se denomina anaplasmosis y es una de las enfermedades infecciosas principales del ganado. En Europa, *A. phagocytophilum* es transmitido por garrapatas de *I. ricinus* (Víchová et al. 2011).

La piroplasmosis o babesiosis es una enfermedad causada por parásitos hemoprotozoicos transmitidos por garrapatas que comprenden varias especies de *Theileria spp.* y *Babesia spp.* (García-Sanmartín et al. 2016).

Se conoce que los parásitos hemoprotozoicos transmitidos por garrapatas, *Babesia spp.* y *Theileria spp.*, producen anemia en los animales infectados.

Babesia spp. es un protozoo parásito del orden Piroplasmida que infecta eritrocitos. La enfermedad normalmente afecta al ganado, pero también puede afectar al ser humano. La especie predominante de *Babesia spp.* en Europa es *B. divergens* cuyo hábitat predominante es el clima templado. En este caso, el transmisor típico es la garrapata *Dermacentor reticulatus*.

Al orden Piroplasmida pertenece también otro patógeno importante – *Theileria spp.* Este protozoo necesita primero leucocitos y después eritrocitos para completar su ciclo de vida en los hospedadores, que suelen ser los mamíferos.

En particular, el género *Theileria* se distingue por la infección de leucocitos por esporozoitos, la maduración de los esquizontes en merozoitos y la posterior infección de los glóbulos rojos para formar piroplasmas (Uilenberg 2006; Mans et al. 2015). Dentro de este género existen dos especies principales, *T. annulata* y *T. orientalis*.

Theileria annulata (Dschunkowsky y Luhs, 1904) produce la enfermedad, teileriasis o piroplasmosis. La teileriasis producida por *T. annulata* se denomina, más concretamente, teileriasis mediterránea o teileriasis tropical y produce el tipo de teileriasis de mayor incidencia de todas. Los hospedadores intermediarios suelen ser las garrapatas del género *Hyalomma*. Este género se localiza en China, Oriente Próximo, África, Balcanes, apareciendo tanto en España como en Eslovaquia. *T. annulata* es por lo tanto un protozoo parásito intracelular obligado del ganado vacuno y del búfalo doméstico (Fig. 1). Los principales signos clínicos asociados con la infección incluyen fiebre, inflamación de los ganglios linfáticos superficiales, inapetencia, taquicardia, disnea y debilidad, anemia. La leucopenia y la linfocitopenia son las alteraciones hematológicas más comunes en la infección aguda por *T. annulata* pudiendo producir una disminución de la producción de leche en infecciones crónicas de ganado lechero (Ros-García et al. 2012).

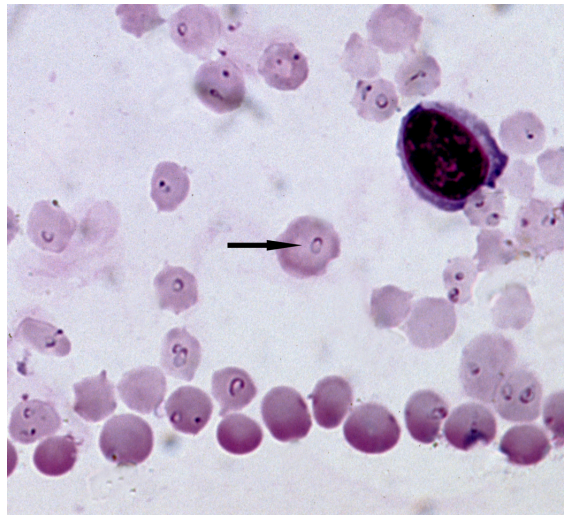


Fig. 1. Fotografía microscópica de frotis de sangre de bovino con los eritrocitos infectados con parásitos *Theileria annulata* causantes de la piroplasmosis en ganado. La flecha señala el protozoo *Theileria annulata* (fuente: Wikipedia).

La otra especie *T. orientalis* (Yakimoff y Soudatschenkoff, 1931) parasita los eritrocitos del animal hospedador y los destruye. Es responsable de la enfermedad conocida como teileriasis benigna o no transformante. Realmente el grupo *T. orientalis* consiste en varios parásitos estrechamente relacionados entre sí: *T. sergenti* (Yakimoff y Dekhtereff, 1930), *T. buffeli* (Morel y Uilenberg, 1981) y *T. orientalis*. Son protozoos parásitos intracelulares que presentan diferentes formas (ovalado, redondo, forma de coma y otras), siendo normalmente de un tamaño más grande que otros representantes del género *Theileria* spp. Este grupo es típico en Japón, China y Corea, pero debido a la globalización mundial su infección se está extendiendo por todo el mundo.

Los síntomas de las enfermedades producidas por todos los patógenos mencionados previamente, *Theileria* spp., *Babesia* spp. y *A. phagocytophilum* son muy parecidos (anemia, pérdida del peso, letargo y fiebre). De todos ellos, la infección por *Theileria* spp. es la más importante a la escala mundial, sobre todo debido al transporte de animales vivos. Hay que tener en cuenta que las enfermedades zoonóticas (transmisión animales-humanos) parasitarias mencionadas anteriormente se pueden transmitir tanto de vectores o transmisores (garrapatas) al animal como de un animal a otro (dentro de una manada). En este segundo caso se habla de transmisión transovárica u/o transestadial. La transmisión transovárica ocurre cuando una hembra infectada transmite los patógenos a los huevos que pone. Esta transmisión es más común para las infecciones fuertes generalizadas como es por ejemplo virus de la encefalitis transmitida por garrapatas. La transmisión transestadial ocurre cuando un estadio de garrapata es infectado y al mudar se mantiene en el siguiente estadio. Este tipo de transmisión es la más común. Debido a que cada estadio de parásito se alimenta de animales de diferente tamaño, puede así transmitir diferentes tipos de patógenos entre los animales de una determinada zona (por ejemplo, debido a esto se pueden transmitir enfermedades transmitidas por garrapatas de una rata a una vaca). Esto significa que cuando aparezca un patógeno dentro de una población de animales, la infección se puede propagar entre otros miembros de la población, lo que implica un riesgo general para la población entera. Otra forma alternativa de transmitir la infección es la transmisión mecánica (este tipo se conoce para los parásitos *Anaplasma* spp.) que se produce a través de los insectos chupadores de sangre. Estos insectos transmiten la sangre infectada de los animales en

la fase aguda de la enfermedad a los animales susceptibles. Existe también una transmisión alternativa que se puede producir en las granjas a través de instrumentos contaminados tras la manipulación con los animales.

Debido a su incidencia en las granjas europeas nos centraremos en el estudio de *Babesia spp.* y *A. phagocytophilum*.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es la detección de patógenos transmitidos por los transmisores, garrapatas, potencialmente peligrosos para los bovinos.

Un objetivo secundario es explicar las enfermedades causadas por estos patógenos, su caracterización detallada e importancia a nivel poblacional y mundial.

En el estudio se hace un análisis de sangre de bovinos elegidos al azar de tres ganaderías diferentes (dos de Eslovaquia y una de España) para tener una visión global a la posible aparición de enfermedades que nos interesan en el trabajo. Los resultados del análisis de dos países diferentes, Eslovaquia y España, se comparan y se discuten. Este estudio intenta acercarse al tema de importancia de las infecciones transmitidas por garrapatas y a la necesidad del control de la diseminación de estas enfermedades.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ÁREAS DE ESTUDIO

Las muestras de sangre fueron recogidas durante los años 2017 y 2018 de un total de 24 animales, 16 de Eslovaquia y 8 de España.

Las 16 muestras de Eslovaquia proceden de dos ganaderías diferentes del Este del país. 8 de una ganadería situada en la ciudad de Vranov nad Topľou (48°54`N, 21°40`E), y las otras 8 de una ganadería situada en el pueblo Jastrabie nad Topľou (48°56`N, 21°36`E) (Fig. 2.). Estas muestras una vez obtenidas se llevaron al laboratorio de Instituto Parasitológico de Eslovaquia en unos tubos con anticoagulantes bajo refrigeración. Las 8 muestras de España proceden de una ganadería situada en Galicia en el municipio de Melide (42°55`N, 8°0`E) (Fig. 3.). Estas muestras se transportaron en unos tubos con anticoagulantes hasta el Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA).

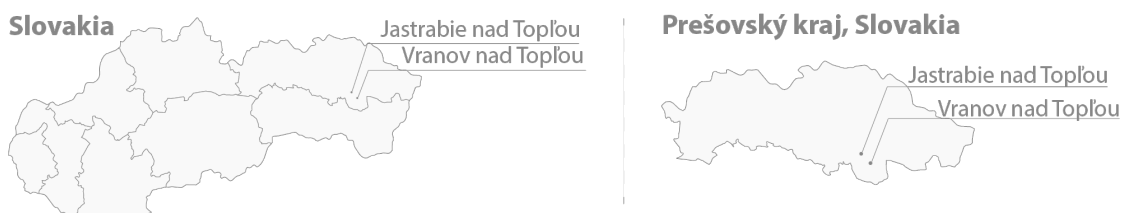


Fig. 2, Mapa de Eslovaquia señalando las divisiones administrativas (regiones) y 2 localizaciones dónde se encuentran las ganaderías (izquierda). Mapa de provincia Prešovský kraj con señaladas localidades de ganaderías investigadas – Vranov nad Topľou (48°54`N, 21°40`E) y Jastrabie nad Topľou (48°56`N, 21°36`E) (derecha).



Fig. 3. Mapa de España señalando las autonomías y una localización dónde se encuentra la ganadería (izquierda). Mapa de región Galicia con señalada la localidad de ganadería investigada – Melide (42°55`N, 8°0`E) (derecha).

3.2. ANÁLISIS DE ADN

El ADN genómico de la sangre de las muestras de Eslovaquia se aisló utilizando NucleoSpin Blood Kit (Macherey-Nagel, Alemania) según la recomendación del

fabricante. El ADN genómico de la sangre de las muestras de Galicia se aisló utilizando NZY Tissue gDNA Isolation Kit (NZY Tech, Portugal) también siguiendo las recomendaciones del fabricante. La detección molecular de patógenos se realizó mediante PCR.

Para determinar la presencia de patógenos de *Babesia spp.* se emplearon los cebadores BJ1 BN2 (Casati et al. 2006) que amplifican un fragmento de ADN ribosómico 18S ~ 450 pb de longitud (Tabla 1). En el caso de las muestras *A. phagocytophilum* la determinación consistió en una amplificación del gen Msp2 de ~ 334 pb de longitud utilizando los cebadores MSP2f y MSP2r (Eberts et al. 2011) (Tabla 1).

Tabla 1: los cebadores usados en PCR

Hospedador/gen	Cebador	Secuencia (5'-3')	Longitud (pb)	Referencia
<i>Babesia spp.</i> 18S rDNA	BJ 1	GTCTTGTAATTGGAATGATGG	450	Casati et al. 2006
	BN 2	TAGTTTATGGTTAGGACTACG		
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> Msp2	MSP2f	CCA GCG TTT AGC AAG ATA AGA G	334	Eberts et al. 2011
	MSP2r	GCC CAG TAA CAT CAT AAG C		

Para cada muestra se realizaron 2 PCRs. La preparación de la mezcla de reacción se hizo utilizando el kit FIREPol® Master Mix Ready to Load con 7,5 mM MgCl₂ (Solis BioDyne, Alemania). La mezcla de reacción se realizó en una caja de refrigeración en una cámara de flujo laminar. Para cada muestra se hizo una solución de reacción de 20 µl que se componía de 5 µl de Master Mix, 1 µl del primer 1, 1 µl del primer 2 y 13 µl de agua estéril. Posteriormente, se añadieron 5 µl de ADN molde. Se utilizaron controles positivos y negativos en las reacciones de PCR. De control positivo se utilizó una muestra en la que la presencia del patógeno ya se había confirmado anteriormente y el control negativo consistía en 5 µl de agua estéril añadida al microtubo en lugar de ADN molde. Los microtubos se colocaron con la mezcla así preparada en un termociclador con los programas de PCR que se detallan a continuación:

Para *Babesia spp.* una desnaturalización inicial de 10 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 55°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. La amplificación se completó con un paso adicional de 5 minutos a 72°C.

Para *A. phagocytophilum* una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante 1 minuto. La amplificación se completó con un paso adicional de 5 minutos a 72°C.

La visualización de las amplificaciones de las PCRs se ha realizado en un gel de agarosa a 1,5% en tampón TAE (Tris acetato EDTA) al que se ha añadido 4 µl de colorante GoldView Nucleic Acid Stain (Beijing SBS Genetech Co. Ltd., China).

Los tamaños de los fragmentos amplificados se compararon con un ADN marcador de 100 pb (GeneRuler, Fermentas, Estados Unidos). La electroforesis en gel horizontal se realizó a 130 V, durante aproximadamente 15-25 minutos.

La muestra de PCR positiva se purificó usando el kit de purificación ISOLATE II PCR and Gel Kit (Bioline, Reino Unido) y se secuenció. Esta se hizo en Laboratorio de Microbiología e Inmunología Biomédica de Universidad de Medicina Veterinaria y Farmacia en Košice, Eslovaquia. Estas secuencias fueron comparadas con las existentes de GenBank mediante Blast N2.2.13.

4. RESULTADOS

Todas las vacas, tanto de Eslovaquia como de España, fueron analizadas para la presencia de *Babesia* spp. y *A. phagocytophilum*. El análisis se hizo de la sangre extraída de las vacas, cuya extracción fue realizada por los veterinarios encargados de los animales. Los parásitos *Theileria* spp. se analizan junto con *Babesia* spp. y se diferenciarán en la secuenciación genómica de muestras positivas a *Babesia* spp.

De la primera ganadería analizada – localizada en Vranov nad Topľou (localidad 1), sólo una vaca (número 4167) fue positiva para *Babesia* spp. (tabla 2.) lo que se observa en el gel de electroforesis en la Fig. 4. Esta muestra fue enviada a la secuenciación del ADN. El análisis BLAST confirmó un 99% de similitud con las secuencias de nucleótidos de *Theileria annulata* aislado Haryana 4 (Acc.No. MF287924), de *T. sergenti* aislado 126 de *Rhipicephalus annulatus* ninfa eliminada del ganado en Italia (Acc.No. KX375823), de *T. buffeli* aislado HS252 de sangre de ganado indígena coreano (Acc.No. KX965722), de *T. orientalis* aislado Kempey 6, Australia, ganado (Acc. No. AB520953) y en otros en menor proporción. Esta muestra sin embargo era negativa para *A. phagocytophilum*. El resto de vacas de la localidad 1 fueron negativas tanto para *Babesia* spp. como para *A. phagocytophilum*.

Tabla 2: Resultados del análisis de vacas para *Babesia* spp. y *Anaplasma phagocytophilum*. Ganadería localizada en Vranov nad Topľou, Eslovaquia; análisis 25.7. 2017 (localidad 1).

Número de vaca	<i>Babesia</i> spp.	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>
2033 (1)	-	-
1745 (2)	-	-
4023 (3)	-	-
4167 (4)	+	-
0643 (5)	-	-
0659 (6)	-	-
3431 (7)	-	-
4495 (8)	-	-

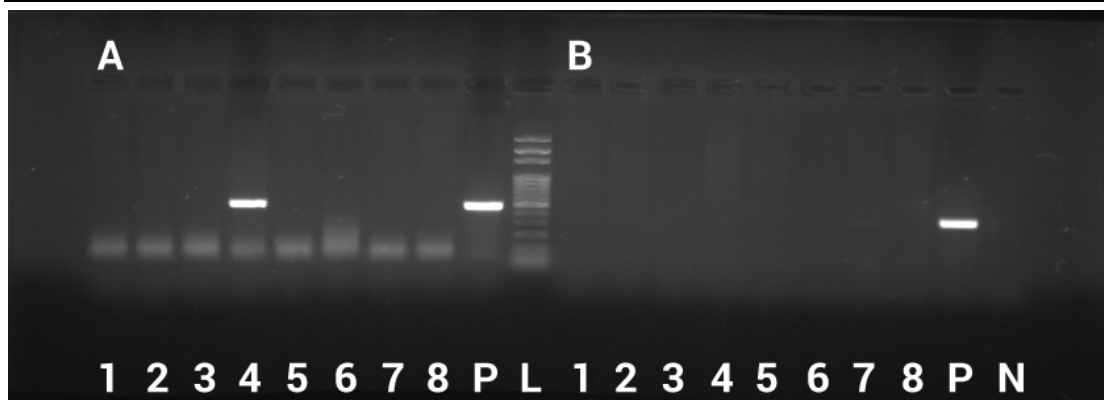


Fig. 4: Electroforesis en gel de agarosa que muestra ADN amplificado para: (A) *Babesia spp.*; 1-8 muestras de animales con genoma amplificado; P - control positivo; L – 100bp marcador. (B) *Anaplasma phagocytophilum*; 1-8 muestras de animales con genoma amplificado; P – control positivo; N – control negativo.

La segunda ganadería de Eslovaquia – localizada en Jastrabie nad Topľou (localidad 2) no presentó ninguna muestra positiva para *Babesia spp.* ni para *Anaplasma phagocytophilum* (tabla 3.) lo que vemos en el resultado de la visualización del gel de electroforesis en la Fig. 5.

Tabla 3: Resultados del análisis de vacas para *Babesia spp.* y *Anaplasma phagocytophilum*. Ganadería localizada en Jastrabie nad Topľou, Eslovaquia; análisis 23.8. 2017 (localidad 2).

Número de vaca	<i>Babesia spp.</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>
2038 (1)	-	-
2917 (2)	-	-
2035 (3)	-	-
3503 (4)	-	-
3427 (5)	-	-
4466 (6)	-	-
6189 (7)	-	-
7172 (8)	-	-

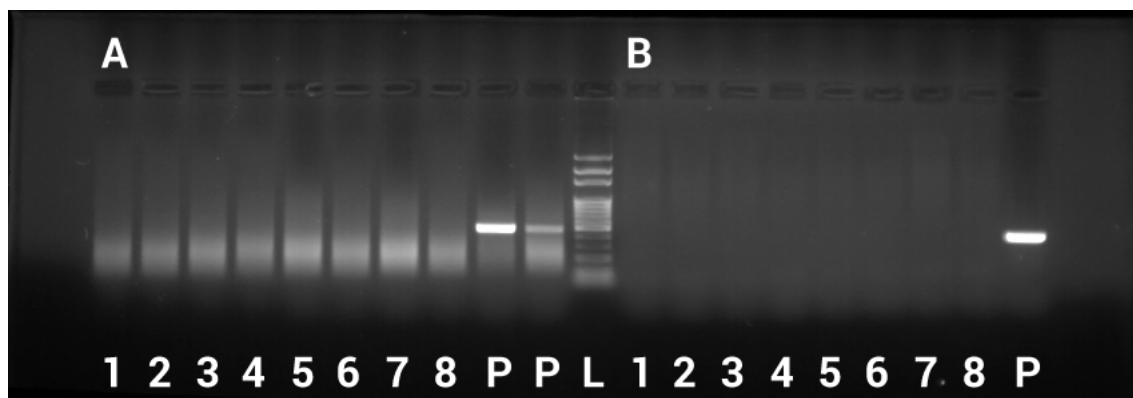


Fig. 5: Electroforesis en gel de agarosa que muestra ADN amplificado para: (a) *Babesia spp.*; 1-8 muestras de animales con genoma amplificado; P - control positivo; L – 100bp marcador. (b) *Anaplasma phagocytophilum*; 1-8 muestras de animales con genoma amplificado; P – control positivo.

En el caso de España se analizaron muestras de la ganadería localizada en el municipio Melide (localidad 3). De las 8 muestras elegidas al azar, ninguna muestra era positiva para *Babesia spp.* ni *A. phagocytophilum* (tabla 4.), lo que se observa en la visualización del gel de electroforesis en Fig. 6.

Tabla 4: Resultados del análisis de vacas para *Babesia spp.* y *Anaplasma phagocytophilum*. Ganadería localizada en Melide, España; análisis 28.3. 2018 (localidad 3).

Número de vaca	<i>Babesia spp.</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>
0478 (1)	-	-
5404 (2)	-	-
6682 (3)	-	-
0477 (4)	-	-
7224 (5)	-	-
7223 (6)	-	-
7222 (7)	-	-
6675 (8)	-	-

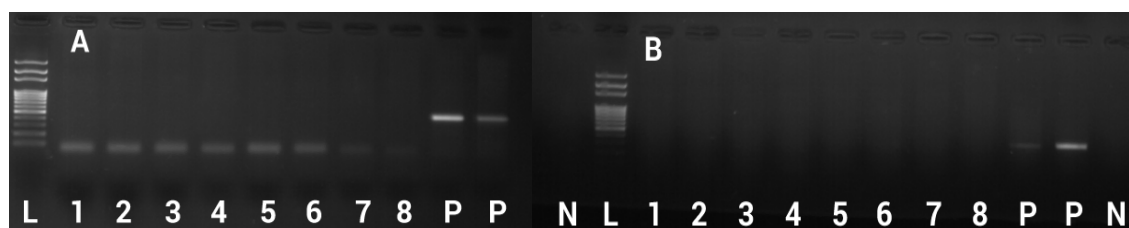


Fig. 6 Electroforesis en gel de agarosa que muestra ADN amplificado para: (A) *Babesia spp.*; L -100bp marcador; 1-8 muestras de animales con genoma amplificado; P - control positivo; N – control negativo. (B) *Anaplasma phagocytophilum*; L - 100bp marcador; 1-8 muestras de animales con genoma amplificado; P – control positivo; N – control negativo.

Según los resultados de las muestras analizadas de Eslovaquia (de las dos granjas), la prevalencia promedio del orden Piroplasmida era de unos 6,25%. La prevalencia en España no se podía calcular (o sería 0%) ya que todas las muestras elegidas aleatoriamente fueron negativas.

5. DISCUSIÓN

Según los resultados de este trabajo, parece que no hay una alta prevalencia de anaplasmosis ni piroplasmosis en el ganado de ganaderías seleccionadas de Eslovaquia y España. Obviamente hay que tener en cuenta que se ha analizado un número tan pequeño de animales que fueron elegidos al azar (es decir no presentaban ningunos síntomas de enfermedades), por lo que los resultados no son concluyentes, pero este trabajo si que constituye una pequeña introducción al aprendizaje y desarrollo de las técnicas descritas. Hoy en día podría parecer que ya no hay animales enfermos o que falta el transmisor de enfermedad – las garrapatas. Existen varios estudios y los veterinarios nos confirmaron que siguen apareciendo las enfermedades citadas previamente en el ganado (consulta personal con MVDr. Juraj Marcin). Tampoco se puede decir que los transmisores faltan, ya que en este estudio no se hizo el monitoreo de las poblaciones de las garrapatas.

Los animales de las ganaderías del Este de Eslovaquia están cuidados, alimentados y se les proporcionan vitaminas y agentes antiparasitarios y cumple las revisiones veterinarias pertinentes (apreciación personal).

Así esos agentes antiparasitarios podrían ser la razón de muestras negativas para los patógenos mencionados previamente. Pero, como una muestra salía positiva a *T. annulata* o *T. sergenti*, se puede deducir que los patógenos se encuentran en el hábitat. Hay que tener en cuenta que se necesitaría solo un animal para producir una epidemia de enfermedad, ya que la pueden transmitir las garrapatas del animal infectado a los animales libres de infección. La ganadería situada en Melide (Galicia, España) no presentaba ningún animal enfermo. Este resultado negativo se podría deber al tiempo de recogida de sangre (invierno, frío, abundantes lluvias) o a otros factores mencionados anteriormente.

Las garrapatas pertenecen al grupo epidemiológicamente más significativo y más extendido de artrópodos ectoparásitos que se alimentan de la sangre. Cumplen una función importante de los vectores en la transmisión y reservorios de diversos agentes patógenos de enfermedades animales y humanas. Debido a su representación estructurada y de diversas áreas climáticas, Eslovaquia es un área adecuado para la aparición, transmisión y propagación de enfermedades transmisibles con la naturaleza del enfoque natural (Peřko y Majláthová, 2005). En el caso de España, el clima y la vegetación varían de Norte a Sur, lo que afecta la distribución de garrapatas y, en consecuencia, la presencia de enfermedades transmitidas por garrapatas (Barandika et al. 2011).

Los dos países, Eslovaquia y España, presentan condiciones ideales para el desarrollo adecuado de las enfermedades transmitidas por garrapatas que representan una amenaza para los hospedadores típicos (entre ellos el ser humano).

El clima afecta significativamente la propagación de garrapatas de *I. ricinus* en nuevas áreas (Tälleklint and Jaenson, 1998; Lindgren et al. 2000; Daniel et al. 2003; Randolph, 2004; Materna et al. 2005; Danielová et al. 2008). En relación con los cambios ambientales, están surgiendo nuevas localizaciones adecuadas para la supervivencia de las garrapatas en las áreas donde las condiciones no eran favorables en el pasado. Este hecho también afecta la epidemiología de las enfermedades transmitidas por garrapatas y la formación de nuevas relaciones huésped-parásito (Majláthová et al. 2011).

Este resultado podría ocurrir por diferentes razones, entre ellos, cambio climático, cambio de paisaje, dinámica de población de animales, migración.

En Eslovaquia en los últimos años, el límite latitudinal ha aumentado debido a cambio climático y calentamiento global. Según Balajka et al. (2005) la temperatura media anual subió en más de 1°C en Eslovaquia durante los últimos 25 años. En España se predice el efecto parecido. El año 2017 ha sido extremadamente cálido en España, con una temperatura media de 16,2 °C, valor que supera en 1,1 °C al valor medio anual (período de referencia 1981-2010) (AEMET, 2017).

En general, estos fenómenos se han asociado a cambios complejos ecológicos y climáticos que han favorecido y aumentado las densidades de los vectores y sus reservorios, pero también se han visto afectados por procesos que han sido desencadenados o acelerados por el hombre tales como la globalización, desarrollo, deforestación y cambios en el uso de la tierra (Calle et al. 2017).

Gracias a su distribución elevada, muchas enfermedades transmitidas por garrapatas se propagan dentro del ganado y entre diferentes países europeos que, sobre todo, comparten condiciones ideales (como temperatura y humedad) para la propagación exitosa de varias enfermedades (sobre todo las que transmiten garrapatas).

Entre los fenómenos que favorecen la propagación de enfermedades transmitidas por garrapatas destaca el calentamiento global. No es el único factor, pero es importante, ya que, gracias a este fenómeno, el rango de distribución se extiende cada vez más (hacia el norte y a las alturas más elevadas). También se sabe que las garrapatas son bastante resistentes y son capaces de adaptarse a las condiciones adversas, lo que favorece su propagación entre países y entre continentes. Sobre todo, la propagación entre continentes podría afectar la dinámica de parásito-hospedador. Este tipo de propagación podría ser peligroso, ya que la llegada de nuevas cepas de enfermedades podría cambiar la dinámica de animales y podría posiblemente producir epidemias de nuevas enfermedades que no son controladas en países receptores.

Según esto las áreas de distribución de garrapatas deberían aumentar, pero los resultados de este estudio no lo demuestran. Una posible explicación podría ser que las enfermedades estudiadas (anaplasmosis y piroplasmosis) van disminuyendo a lo largo del tiempo, pero para confirmar esto se deberían hacer estudios adicionales. Otra explicación más probable es que, como las vacas fueron elegidas al azar, simplemente no coincidió con los animales infectados.

La abundancia de garrapatas en una determinada localidad no solo depende del clima, también de otros factores, entre ellos destacamos factores bióticos (abundancia de huéspedes, hábitat adecuado, frecuencia de contacto garrapata-humano o garrapata-animal) y factores abióticos (humedad, temperatura y precipitación). Otro factor importante es la probabilidad de infección, presencia de animales infectados o no infectados y su densidad poblacional. Gracias a todo esto, las garrapatas aumentaron en número en los últimos años, lo que representa un riesgo para la salud de los animales y salud pública. (Schwarz et al. 2012).

Este estudio intenta acercarse al tema de importancia de las infecciones transmitidas por garrapatas y a la necesidad del control de la diseminación de estas enfermedades.

Las garrapatas *I. ricinus* están ampliamente distribuidas en regiones climáticas moderadas de Europa, tanto en hábitats naturales como urbanos (Pangrácová et al. 2013), siendo esta garrapata la especie más abundante en España (Barandika et al.

2014). *I. ricinus* es el transmisor típico de *A. phagocytophilum*, pero puede transmitir otros patógenos, entre ellos *T. annulata* o *T. sergenti*, que se han encontrado en el ganado. *I. ricinus* es la garrapata más abundante en Europa en el hemisferio norte, pero aparecen otros, también transmisores importantes de enfermedades, entre ellos *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Haemaphysalis spp.*, *Hyalomma spp.*

La única muestra positiva presentó infección con *T. annulata* o *T. orientalis*, patógenos que en el pasado aparecían solo en Asia, pero a lo largo del tiempo y gracias a los fenómenos de importación y exportación de animales por todo el mundo, han aparecido en otros continentes, también en Europa. Como pertenece al mismo orden que *Babesia spp.*, el análisis por PCR se hace sólo para la presencia de *Babesia spp.* Los síntomas de la infección se parecen a los de que produce *Babesia spp.*, entre ellos anemia, inmunidad baja, pérdida del peso, crecimiento retardado. La enfermedad normalmente no es letal, pero presenta riesgo para la población.

La vaca número 4167 no presentaba ninguno de estos síntomas, ya que se han elegido animales al azar que estaban en un buen estado físico. Evidentemente, el animal puede padecer la enfermedad y no presentar síntomas. Los animales adultos, fuertes y sobretodo sanos, pueden estar infectados y no les molestaría, pero el parásito que produce la infección se queda en su sangre. En el caso de estrés prolongado o cambios importantes que debilitan al animal (hembras preñadas, lactancia y otros) se podría activar el parásito y producir problemas de salud, que posiblemente podrían ser peligrosos para el animal en peor estado físico. La infección se puede transmitir a la descendencia a través de la placenta, lo que lleva un peligro importante para embrión y animal joven. Las vacas preñadas son más susceptibles a desarrollar teileriasis que las vacas no preñadas. Este conocimiento es muy importante, ya que la infección representa un amenaza para sus crías, lo que supone una posible pérdida económica.

Teileriasis afecta a los eritrocitos, que se transmiten fácilmente de los animales adultos infectados a los descendientes, los que nacerán ya infectados con *T. annulata* o *T. orientalis*.

La secuenciación confirmó que el animal estaba infectado con *T. annulata* o *T. orientalis*. Aunque los frotis de sangre suelen ser rutinarios para la detección de la enfermedad, en este caso no se hicieron, ya que en el caso de *T. annulata* o *T. orientalis*, los eritrocitos infectados son difícilmente detectados y aparecen en una frecuencia muy baja. Los estudios de Shimizu et al. (1991) demuestran que muchas vacas son permanentemente infectadas con *T. orientalis* y no presentan ninguno de los síntomas anteriormente descritos. También es cierto que, después de la recuperación de la enfermedad, el ganado presenta valores altos de anticuerpos contra *T. orientalis*. El ganado puede desarrollar la enfermedad con los síntomas junto con el estrés o inmunidad más baja (tiempo de lactancia o cuando están preñadas). Sin que ocurra esto, el animal puede estar infectado con *T. annulata* o *T. orientalis* pero permanecerá sin los síntomas durante mucho tiempo de su vida. En este sentido hay que tener en cuenta que los animales que se recuperan de infecciones agudas o primarias permanecen infectados crónicamente y actúan como reservorios para las garrapatas (Yin et al. 2007, Tian et al. 2015). La mortalidad en el ganado no es muy común, pero a veces puede ocurrir la anemia crónica progresiva en los animales previamente infectados con *T. orientalis*.

La piroplasmosis es una de las enfermedades más relevantes de los animales domésticos (Zanet et al. 2014). La importancia de controlar la infección con *T. annulata* o *T. orientalis* se basa prácticamente en el concepto de no propagar la enfermedad por

la población entera a través de las garrapatas o a través de placenta (en el caso de transmisión adulto-cría = transmisión transplacentaria).

El estudio se centró en una raza bovina que en el pasado no se ha criado ni en Eslovaquia ni en España. Hoy en día, son cada vez más distribuidas por el mundo, ya que es una raza con alta preferencia por los consumidores gracias a su carne de buena calidad y escasa cobertura de grasa.

La infección por *T. annulata* o *T. orientalis* se puede transmitir por todo el mundo sin saberlo, y la mayoría de vacas que se compran son en un buen estado y no presentan ningunos síntomas previamente descritos. Lo que representa un problema bastante grave, ya que la mayoría de las vacas que llevan la infección, no presentan síntomas de la enfermedad. Tampoco la vaca de nuestro estudio, que era positiva a *T. annulata* o *T. orientalis*, no presentaba ningún síntoma aparente, ya que las vacas fueron elegidas al azar y los criadores junto con los veterinarios no nos informaron de ningún problema de salud.

6. a. CONCLUSIONES

1. La técnica de PCR resultó útil utilizando dos cebadores diferentes (BJ1 BN1 y MSP2f MSP2r) para la detección de *Babesia spp.* y *A. phagocytophilum* respectivamente.
2. De las tres granjas analizadas (24 animales aparentemente sanos) sólo una vaca estaba infectada con *T. annulata* o *T. orientalis*.

6. b. CONCLUSIONS

1. The PCR technique was useful using two different primers (BJ1 BN1 and MSP2f MSP2r) for the detection of *Babesia spp.* and *A. phagocytophilum* respectively.
2. Of the three farms analyzed (24 apparently healthy animals), only one cow was infected with *T. annulata* or *T. orientalis*.

6. c. ZÁVERY

1. Metóda PCR bola užitočná pri použití dvoch rôznych primerov (BJ1 BN1 a MSP2f MSP2r) na detekciu *Babesia spp.* a *A. phagocytophilum*.
2. Z troch analyzovaných fariem (24 zdanlivo zdravých zvierat) bola infikovaná iba jedna krava s *T. annulata* alebo *T. orientalis*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Balajka J, Lapin M, Mindáš J, Šťastný P y Thalmeirová D. 2005. *Štvrtá národná správa o zmene klímy a Správa o dosiahnutom pokroku pri plnení Kjótskeho protokolu*. Bratislava: MŽP SR, SHMÚ. 17-19.
- Barandika JF, Olmeda SA, Casado-Nistal MA, Hurtado A, Juste RA, Valcarcel F, Anda P y García-Pérez AL. 2011. Differences in Questing Tick Species Distribution between Atlantic and Continental Climate Regions in Spain. *Journal of Medical Entomology* 48: 13-19.
- Calle AI, Mari RB, de las Heras E, Lucientes J y Molina R. 2017. Climate Change in Spain and its Influence on Vector-Transmitted Diseases. *Revista de Salud Ambiental* 17: 70-86.
- Daniel M, Danielová V, Kříž B, Jirsa A y Nožička J. 2003. Shift of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne encephalitis to higher altitudes in central Europe. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 22: 327–328.
- Danielová V, Schwarzová L, Materna J, Daniel M, Metelka L, Holubová J y Kříž B. 2008. Tick-borne encephalitis virus expansion to higher altitudes correlated with climate warming. *International Journal of Medical Microbiology* 298: 68-72.
- García-Sanmartín J, Nagore D, García-Pérez AL, Juste RA y Hurtado A. 2006. Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays. *BMC Veterinary Research* 2: 16.
- Lindgren E, Talleklint L y Polfeldt T. 2000. Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environmental Health Perspectives* 108: 119-123.
- Majláthová V, Majláth I, Víchová B, Guľová I, Derdáková M, Sesztáková E y Peťko B. 2011. Polymerase chain reaction Confirmation of *Babesia canis canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in Dogs Suspected of Babesiosis in Slovakia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11: 1447-1451.
- Mans BJ, Pienaar R y Latif AA. 2015. A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. *International Journal for Parasitology* 4: 104-118.
- Materna J, Daniel M y Danielova V. 2005. Altitudinal distribution limit of the tick *Ixodes ricinus* shifted considerably towards higher altitudes in Central Europe: Results of three years monitoring in the Krkonose Mts. (Czech Republic). *Central European Journal of Public Health* 13: 24-28.
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. 2017. Resumen anual climatológico. Disponible en <http://www.aemet.es/documentos/es/serviciosclimaticos/vigilancia_clima/resumenes_climat/anuales/res_anual_clim_2017.pdf>. Consulta 24-5-2018.
- Pangráčová L, Derdáková M, Pekárik L, Hviščová I, Víchová B, Stanko M, Hlavatá H y Peťko B. 2013. *Ixodes ricinus* abundance and its infection with the tick-borne pathogens in urban and suburban areas of Eastern Slovakia. *Parasites & Vectors* 6: 238.
- Peťko B y Majláthová V. 2005. Kliešte v podmienkach globálnych zmien. *DUBINSKÝ P. a i. ŠPAKULOVÁ M. (ed) Vybrané kapitoly zo všeobecnej parazitológie*. Košice: PaÚ SAV, 2005. ISBN 80-968473-4-1: 115-133.
- Ros-García A, Nicolás A, García Pérez AL, Juste RA y Hurtado A. 2012. Development and evaluation of a real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria annulata* in cattle. *Parasites & Vectors* 5: 171.

- Shimizu S, Yoshiura N, Mizomoto T y Kondou Y. 1991. *Theileria sergenti* Infection in Dairy Cattle. *The Journal of Veterinary Medical Science* 54: 375-377.
- Schwarz A, Honig V, Vavruskova Z, Grubhoffer L, Balczun C, Albring A y Schaub GA. 2012. Abundance of *Ixodes ricinus* and prevalence of *Borrelia burgorferi* s.l. in the nature reserve Siebengebirge, Germany, in comparison to three former studies from 1978 onwards. *Parasites & Vectors* 5: 268.
- Talleklint L y Jaenson TGT. 1998. Increasing geographical distribution and density of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in central and northern Sweden. *Journal of Medical Entomology* 35: 521-526.
- Tian Z, Du J, Yang J, Liu A, Liu X, Liu G y Yin H. 2015. A PCR-RFLP Assay targeting RPS8 gene for the discrimination between bovine *Babesia* and *Theileria* species in China. *Parasites & Vectors* 8: 475.
- Uilenberg G. 2006. *Babesia* – A historical overview. *Veterinary Parasitology* 138: 3-10.
- Víchová B, Majláthová V, Nováková M, Majláth I, Čurlík J, Bona M, Komjáti-Nagyová M y Peťko B. 2011. PCR detection of re-emerging tick-borne pathogen, *Anaplasma phagocytophilum*, in deer ked (*Lipoptena cervi*) a blood-sucking ectoparasite of cervids. *Biologia* 6: 1082-1086.
- Yin H, Schnittger L, Luo J, Seitzer U y Ahmed JS. 2007. Ovine theileriosis in China: a new look at an old story. *Parasitology Research* 101: 191-5.
- Zanet S., Trisciuglio A., Bottero E., de Mera IGF., Gortazar C., Carpignano MG. y Ferroglio E. 2014. Piroplasmosis in wildlife: *Babesia* and *Theileria* affecting free-ranging ungulates and carnivores in the Italian Alps. *Parasites & Vectors* 7: 70.