

La Theileriosis bovina en España y su diagnóstico seroepidemiológico

Bovine theileriosis in Spain and its seroepidemiological diagnosis

VISERAS, J., GARCÍA-FERNÁNDEZ, P. y ADROHER, F. J.

Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, 18071 Granada, España.

Centro de Investigación y Desarrollo Agrario de Granada, Camino de Purchil s/n, 18071 Granada, España.

RESUMEN

En este artículo se revisa brevemente la theileriosis mediterránea o tropical, enfermedad producida por el protozoo parásito *Theileria annulata* que afecta al ganado bovino de nuestro país, y su diagnóstico seroepidemiológico, haciendo hincapié en las ventajas de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para el mismo y en el empleo de distintas formas del parásito como antígeno para esta técnica. Además, se comunica el desarrollo de un kit de diagnóstico por IFI y los primeros resultados obtenidos con el mismo. Seroprevalencias mayores del 60% han sido detectadas con nuestro kit de IFI en zonas del sur de España.

Palabras clave: Theileriosis mediterránea, *Theileria annulata*, serodiagnóstico, IFI.

ABSTRACT

In this paper, the Mediterranean or tropical theileriosis, a disease which affect to cattle in Spain and other countries, and its seroepidemiological diagnosis are reviewed briefly. It is focused on the advantages of immunofluorescent antibody technique (IFAT) in the diagnosis of this disease caused by the protozoan parasite *Theileria annulata*. The use of different stages of this parasite as antigen is discussed. Besides, the development of an IFAT kit and its preliminary results are commented on. Seroprevalences higher than 60% have been detected in Southern Spain areas with this kit.

Key words: Mediterranean theileriosis, *Theileria annulata*, serodiagnosis, IFAT.

THEILERIOSIS MEDITERRANEA BOVINA

Theileria annulata es un protozoo parásito del ganado bovino que se transmite por garrapatas del género *Hyalomma* (20, 28, 33) y da lugar a una parasitosis del ganado bovino conocida como theileriosis tropical o mediterránea. En uno de los estadios de su ciclo de vida se presenta en formas intraeritrocíticas, identificadas por primera vez en ganado procedente de Transcaucasia, en la antigua Unión Soviética (10). Se observó una semejanza entre este parásito y *Piroplasma parvum* (= *T. parva*), previamente descrito por Koch en 1898 en el este de Africa, si bien los protozoos encontrados en las reses de Transcaucasia eran en su mayor parte redondeados mientras que *P. parvum* presentaba forma de varilla, por lo que fueron denominados *P. annulatum*.

Al ser inoculado por la garrapata, el parásito invade las células del sistema linfático del bovino, donde se desarrolla por esquizogonia. Los esquizontes ya habían sido observados con anterioridad, tanto en ganado de Transcaucasia como en el del este de Africa, pero la relación entre las formas intraeritrocíticas y los esquizontes no fue establecida hasta 1910 por Gonder (30). Este descubrimiento condujo a Wenyon en 1926 (43) a la reclasificación de este organismo y su inclusión en el género *Theileria* (1).

El desarrollo del parásito dentro del hospedador vertebrado (ver figura) comienza por una fase linfoproliferativa, en la que los esporozoítos, inoculados por el vector, invaden células linfoides y, por esquizogonia, forman en un plazo de 5 a 8 días los esquizontes, conocidos hasta hace algunos años como cuerpos azules de Koch, que se localizan primeramente en los ganglios linfáticos próximos a la zona de inoculación y posteriormente se desarrollan en vísceras (hígado, bazo,...).

El desarrollo intracelular del parásito conduce a otras modificaciones de la célula hospedadora, de forma que ésta se desdiferencia a célula linfoblastoide, produciéndose una división sincrónica de parásito y célula hospedadora (36).

Según Hulliger y col. (19), este sincronismo en la división está provocado por la tracción del huso mitótico de la célula en división que, como consecuencia, causa la ruptura del esquizonte; de esta forma cada célula hija contiene un esquizonte, producido por escisión del esquizonte inicial.

Posteriormente, la fase linfoproliferativa evoluciona hacia la aparición de merozoítos, por esquizogonia, que lleva finalmente a la lisis de la célula linfoblastoide, pasando los merozoítos a la sangre e invadiendo eritrocitos, en los cuales tienen la capacidad de dividirse asexualmente (dando lugar a típicas formas en cruz de Malta) conduciendo finalmente a su lisis.

La evolución del parásito en la res da lugar al desarrollo de un cuadro clínico, cuyos síntomas más destacados son la hipertermia, que va de 40 a 42 °C, y el infarto de los ganglios linfáticos superficiales, en particular de los preescapulares y precurales (29). Según Wagner y Duffus (42) se produce

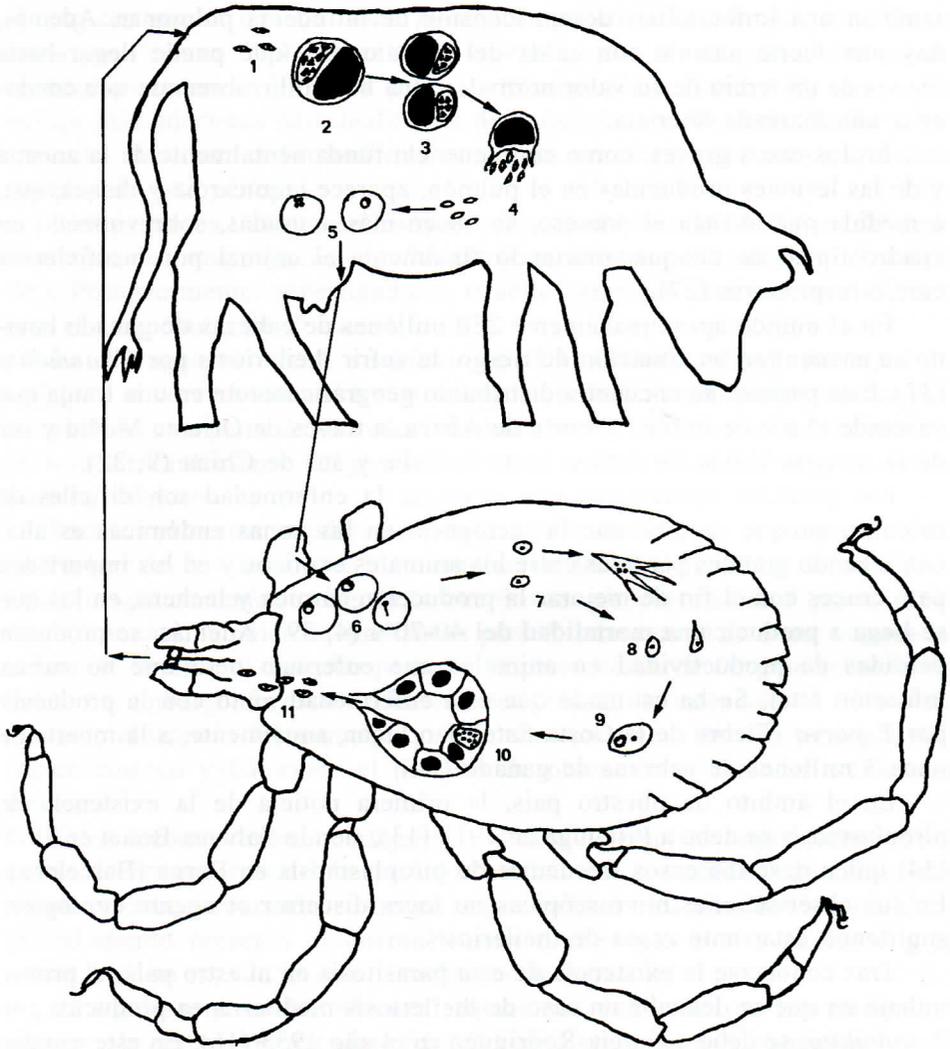


Figura.—Ciclo biológico abreviado de *Theileria annulata*. Los esporozoítos (1) inoculados durante la alimentación (ingesta de sangre) de las garrapatas vectoras (género *Hyalomma*) sobre el hospedador bovino, penetran en las células linfoides de éste (2), dando lugar a esquizontes que se dividen sincrónicamente con la célula hospedadora (3). El esquizonte origina merozoítos (4) que tras la ruptura de la célula linfocítica invaden los eritrocitos (5) donde pueden sufrir una esquizogonia intraeritrocítica. Al alimentarse una nueva garrapata sobre ganado bovino infectado, ingiere glóbulos rojos parasitados con merozoítos (6). En el intestino de la garrapata, los merozoítos se liberan durante la digestión (7) y algunos pueden dar lugar a la formación de los gametos (8) masculino y femenino, que se fusionarán para formar un cigoto inmóvil (9) que origina un kineto capaz de penetrar en el citoplasma de células de las glándulas salivales del vector (10), donde se produce una esporogonia con formación de esporozoítos (11) que serán inoculados nuevamente a un hospedador bovino durante la alimentación de la garrapata.

también una linfocitosis desencadenante de un edema pulmonar. Además, hay una fuerte anemia con caída del hematocrito, que puede llegar hasta menos de un tercio de su valor normal, y una hiperbilirrubinemia que conduce a una marcada ictericia.

En los casos graves, como consecuencia fundamentalmente de la anemia y de las lesiones producidas en el pulmón, aparece taquicardia y disnea, que, a medida que avanza el proceso, se hacen más acusadas, sobreviniendo un cuadro típico de choque, muriendo finalmente el animal por insuficiencia cardio-respiratoria (27).

En el mundo aproximadamente 250 millones de cabezas de ganado bovino se encuentran en situación de riesgo de sufrir theileriosis por *T. annulata* (37). Este parásito se encuentra distribuido geográficamente en una franja que va desde el sur de Europa y norte de Africa, a través de Oriente Medio y sur de la antigua Unión Soviética, hasta la India y sur de China (9, 32).

Las pérdidas económicas que ocasiona la enfermedad son difíciles de calcular, aunque se sabe que la incidencia en las zonas endémicas es alta, conllevando grandes pérdidas entre los animales exóticos y en los importados para cruces con el fin de mejorar la producción cárnica y lechera, en los que se llega a producir una mortalidad del 40-70% (4, 39). Además, se producen pérdidas de productividad en animales que enferman pero que no sufren infección fatal. Se ha estimado que esta enfermedad junto con la producida por *T. parva* (Fiebre de la Costa Este) dan lugar, anualmente, a la muerte de unos 3 millones de cabezas de ganado (24).

En el ámbito de nuestro país, la primera noticia de la existencia de piroplasmosis se debe a Pittaluga en 1912 (13), siendo Salvans-Bonet en 1928 (34) quién describe casos frecuentes de piroplasmosis en Berga (Barcelona). En sus observaciones microscópicas no logra discernir el agente etiológico, sugiriendo estar ante casos de theileriosis.

Tras conocerse la existencia de esta parasitosis en nuestro país, el primer trabajo en que se describe un caso de theileriosis mediterránea producida por *T. annulata*, se debe a García-Rodríguez en el año 1933 (16). En este estudio visualiza las formas conocidas como cuerpos de Koch en hígado y bazo.

A partir de este trabajo son numerosas las referencias que van apareciendo en la literatura acerca de esta enfermedad, todas ellas recopiladas en el trabajo de García-Fernández (13) que trata sobre las piroplasmosis del ganado en la Península Ibérica.

ESTUDIOS SEROEPIDEMIOLOGICOS DE LA THEILERIOSIS BOVINA

El diagnóstico serológico se ha revelado como un método útil para la identificación de las especies de *Theileria*. Diversas han sido las pruebas

serológicas que se han utilizado para el diagnóstico de esta parasitosis, sin embargo, Young (44) considera que el método de elección es la inmunofluorescencia indirecta (I.F.I.) y Chema y Brocklesby (7) que es la técnica más adecuada para realizar el diagnóstico específico de *Theileria* en una zona endémica a la theileriosis, incluso en el caso de coexistir varias especies de este género.

Los primeros trabajos en los que se usa el método de I.F.I. para diferenciar entre distintas especies de *Theileria* se deben a Schindler y Wokatch (35). Posteriormente, investigadores israelíes emplean también esta técnica para el diagnóstico de *T. annulata* (31).

En el diagnóstico de *T. annulata* por I.F.I. se han empleado dos tipos de antígeno, el constituido por los piroplasmas (estadio intraeritrocítico del parásito) obtenido a partir de animales infectados y el preparado con los esquizontes (estadio intralinfocitario del parásito), que se obtiene normalmente a partir de cultivos celulares.

Para los primeros estudios serológicos de la theileriosis y, en especial, de la "Fiebre de la Costa Este", se emplearon frotis sanguíneos de animales enfermos que contenían en sus glóbulos rojos los piroplasmas de *T. parva* (35). Posteriormente, también se emplearon para *T. annulata* (12). Pero, aunque la sangre de un animal enfermo permitía la preparación de un gran número de frotis, sin embargo, la estandarización del proceso de infección en el bovino así como el tamaño del animal requerían unas instalaciones y un personal que hacían costoso y laborioso el proceso de obtención y estandarización del antígeno.

Estos inconvenientes condujeron a la idea de emplear esquizontes procedentes de los órganos del hospedador bovino que los podía contener, como hígado o bazo, preparándose bien en impronta bien triturados del órgano. Este procedimiento presenta el mismo inconveniente que el uso de la sangre, siendo incluso más laborioso y menos estandarizable.

El siguiente paso fue obtener esquizontes cultivados en laboratorio en sistemas de cultivo celular tanto para *T. parva* como para *T. annulata*. Desde 1945 se conocía la capacidad de mantenerse y desarrollarse en cultivo in vitro de líneas celulares de tipo linfoblastoide infectadas con esquizontes de *T. annulata* aislados de reses infectadas (38).

Pipano y col. (31) y Malmquist y col. (23) fueron los primeros en utilizar estos cultivos celulares infectados con esquizontes de *Theileria* como antígeno para su empleo en la técnica de IFI. Se comprobó que era un procedimiento con enormes ventajas respecto a los precedentes. El antígeno se obtenía directamente en el laboratorio donde se cultivaban las células infectadas que actuaban como tal. La estandarización se mostró mucho más fácil y fiable que en el caso del empleo de sangre u órganos de los bovinos y no se requerían grandes instalaciones. Además, las células pueden guardarse criopreservadas

cuando no se esté en proceso de preparación de antígeno y descongelarse para cultivarse de inmediato cuando vuelva a ser necesario.

Por otra parte, en el antígeno preparado a partir de la sangre de animales infectados, es importante tener en cuenta que si esta sangre se recoge durante la fase de recuperación de la infección, se pueden haber unido a la superficie de los eritrocitos infectados, anticuerpos específicos frente a la fase intraeritrocitaria lo que puede dar lugar a falsas reacciones positivas (11), fenómeno que se ha puesto en evidencia sobre todo en las infecciones por *Babesia bovis* y *Anaplasma* spp. (otros piroplasmas que afectan al ganado bovino). De modo que empleando el antígeno preparado a partir de esquizontes mantenidos en cultivo celular evitamos este tipo de reacciones.

También hay que tener en cuenta que conseguir un porcentaje constante de células parasitadas es muy difícil en el caso de sangre infectada, ya que depende del momento en que se extraiga la sangre al animal enfermo, mientras que en el cultivo de linfoblastos bovinos infectados con esquizontes de *Theileria*, la parasitación es prácticamente constante y con la ventaja adicional de ser una forma del parásito de mayor tamaño, lo que sin duda facilita en gran medida la lectura de los resultados al microscopio de fluorescencia.

Moll y col. (25) han encontrado una mayor sensibilidad de la técnica cuando emplean como antígeno esquizontes en lugar de piroplasmas, al menos en *T. parva*, pues al realizar una encuesta serológica en la región de Trans-Mara (Kenia) sobre reses de seis meses de edad, usando antígeno constituido por esquizontes y piroplasmas de *T. parva* hallaron que el 94% de estos terneros presentaban anticuerpos detectables frente al antígeno de esquizontes de *T. parva* y sólo el 80% frente al antígeno de piroplasmas del mismo parásito. Así mismo, al realizar una encuesta sobre ganado de mayor edad, observaron que la mayoría de las reses presentaban pocos piroplasmas en sangre y sin embargo se detectaban claramente, con la técnica de IFI, anticuerpos frente a *T. parva*.

En este mismo sentido, Burridge y Kimber (6) ya habían puesto de manifiesto que los anticuerpos frente a los antígenos de esquizontes eran detectables en suero más del doble de tiempo que los anticuerpos generados frente a antígenos de la forma piroplasma, al menos en *T. parva*.

Con el desarrollo de las diferentes técnicas inmunoserológicas han sido numerosos los autores que las han empleado para estudios epidemiológicos de la theileriosis bovina, hasta el punto de convertirse en el método de diagnóstico más ampliamente aplicado (21).

Irvin y Morrison (21) consideran que la especificidad de la I.F.I es muy buena, aunque en alguna ocasión se han citado reacciones cruzadas entre *T. parva* y *T. annulata* (5). De cualquier forma esto no es un problema en España debido a que no existe *T. parva* en nuestro país. Estos autores, además, consideran que los estudios serológicos que se pueden llevar a cabo

gracias a las buenas características de la I.F.I., simultaneados con estudios epidemiológicos y de aislamiento de parásitos, pueden contribuir de forma notable a la adquisición de datos valiosos para determinar estrategias de control de la theileriosis.

Morzaria y col. (26) muestrearon una zona de Sudán dónde se habían registrado de 50 a 60 reses muertas por una enfermedad desconocida y de la que se habían recuperado y sobrevivido otras 40 reses. Tomaron muestras de 25 de ellas, además de otras 5 correspondientes a animales jóvenes que se encontraban enfermos, con una sintomatología propia de theileriosis caracterizada por la presencia de anorexia, diarrea, ictericia y linfadenopatía. Los resultados de las pruebas serológicas, por la técnica de I.F.I., mostraron que el 100% de las reses tenían anticuerpos frente a *T. mutans*, el 83,3% frente a *T. parva* y el 40% frente a *T. annulata*. En este estudio, 10 animales mostraron una infección mixta con presencia de anticuerpos frente a *T. parva* y frente a *T. annulata*, permitiéndose con esta técnica una perfecta identificación de los agentes etiológicos implicados en la epidemia, a pesar de su proximidad filogenética.

Blaha en 1989 (2) clasifica la theileriosis como una enfermedad de carácter epizootico de declaración no obligatoria incluida en la lista B de enfermedades parasitarias que afecta a la sanidad animal. Seguidamente, indica que las técnicas serológicas, particularmente la I.F.I., deben ser empleadas para la investigación y la diferenciación de las especies de *Theileria*. Los primeros trabajos de serodiagnóstico de la theileriosis mediterránea por el método de I.F.I. en nuestro país se deben a Brandau y col. (3) que, en un amplio estudio llevado a cabo en 1989, tuvieron la oportunidad de controlar más de 500 animales de distintas explotaciones lecheras con antecedentes o presencia de piroplasmosis. Los autores concluyen que el método de I.F.I. se revela fundamentalmente como prueba para el seguimiento de la theileriosis en las poblaciones de ganado, determinando una prevalencia de la theileriosis mediterránea superior al 90% en las explotaciones estudiadas de las Comunidades Autónomas de Madrid y Castilla La Mancha.

Habela y col. (18), por su parte, muestrean ganado frisón en el término municipal de Casar de Cáceres y obtienen, por la prueba de I.F.I., una positividad del 7,3%.

Habela y col. (17) llevan a cabo en 1993 un estudio seroepidemiológico sobre ganado frisón de la provincia de Granada. Para la técnica de I.F.I., estos investigadores emplearon como antígeno piroplasmas de *T. annulata*, obteniendo una seroprevalencia del 13,71%, lo que les llevó a considerar a la provincia como zona hipoendémica inestable, con posibilidad de aparición de brotes clínicos de la enfermedad. Así mismo comunican que la theileriosis tropical bovina es una enfermedad que, en España, se presenta sobre todo en el sur, y lo hace con relativa frecuencia, sin embargo no citan cifras precisas sobre su prevalencia.

Teniendo en cuenta lo expuesto, recientemente hemos desarrollado y puesto a punto el método de diagnóstico serológico por I.F.I. de la theileriosis mediterránea empleando cultivos celulares de linfoblastos bovinos parasitados por esquizontes de *T. annulata* de una cepa aislada por nosotros (41) procedente de una zona endémica del sur de España y sueros control frente a ésta (15) y en la actualidad está siendo empleada rutinariamente, mostrándose como una herramienta útil para conocer la importancia real de este parasitismo en algunas zonas ganaderas del sur de España en las que se crían razas selectas de producción láctea y toro de lidia. De hecho, estudios preliminares llevados a cabo con este método sobre reses de ganaderías con antecedentes de theileriosis mediterránea arrojaron una seroprevalencia del 64% sobre 128 reses muestreadas (40). Por otra parte, se han recogido muestras de suero de 221 toros de lidia llegados a Granada desde distintos puntos de España, para las corridas de toros, aunque la mayoría (166 reses) procedentes de las provincias de Sevilla, Cádiz y Badajoz, presentando una seroprevalencia del 75,1% con el mismo método (14).

En los últimos años se ha iniciado el desarrollo y puesta a punto de otras técnicas como la ELISA (22) y la PCR (8) que pueden llegar a ser de gran valor en el diagnóstico clínico y epidemiológico de la theileriosis, como en la actualidad lo está siendo la IFI.

AGRADECIMIENTOS

Queremos mostrar nuestro agradecimiento al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por conceder una beca de Formación de Investigadores a J. Viseras durante el disfrute de la cual ha sido realizado este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BETTENCOURT, A., FRANÇA, C. y BORGES, J.: "Un cas de piroplasmose bacilliforme chez le daim". *Arq. Inst. Bact. Camara Pestana* (1907), Lisboa. 1:341.
- (2) BLAHA, T.: "*Applied Veterinary Epidemiology*" (1989), 343 pp. Elsevier Sci. Publ., Amsterdam.
- (3) BRANDAU, C., MONGE A., FERMÍN, M. L., JIMÉNEZ-MAZZUCHELLI, F. y TESOURO, M. A.: "Tratamiento de la theileriosis bovina con parvacuona y buparvacuona; control y seguimiento". *Vet. Rec. (Edición Española)* (1989): 279-281.
- (4) BROWN, C. G. D.: "Control of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) of cattle". *Parassitologia* (1990), 32:23-31.
- (5) BURRIDGE, M. J., BROWN, C. G. D. y KIMBER, C. D.: "*Theileria annulata*: cross reactions between a cell culture schizont antigen and antigens of East African *Theileria* species in the indirect fluorescent antibody test. *Exp. Parasitol.*" (1974), 35:374-379.