

## Denuncia de *Theileria ovis* en Extremadura (España). Estudio del poder patógeno e inmunógeno de la cepa "Norba-88"

HABELA, M.; REINA, D.; NIETO, C.G.; NAVARRETE, I.

Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. 10.071-Cáceres.

### Summary

After the casual finding of *Theileria ovis* in splenectomised sheep, we carried out some morphological and serological studies, the last one using Immune Fluorescent Antibody (IFA) test. These studies were undertaken in order to characterize this specie. We also study some parameters giving us some informations concerning to its pathogenicity, as well as immunogenic properties.

With the haematological and clinical results obtained, we can qualify this specie as having medium pathogenicity, since it almost does not cause any temperature rise in the host, due to its low parasitaemia level. On the other hand, this low parasitaemia level only causes slight decrease on PCV. This fact is further supported when non splenectomised and experimentally infected animals did not almost showed any changes on the studied parameters.

The latent infection (premunition) was confirmed by determination of antibodies levels using IFA test before splenectomy and by detection of parasite after that. Such levels increased along with parasitaemia once after the surgical operation.

Although imidocarbarol dipropionate was probed ineffective for the treatment, buparvaquone decreased significantly the parasitaemia.

The existence of *T. ovis* in Extremadura is confirmed, and so, we can think that this specie can be one of the aetiological agents of anemic diseases in sheep.

**Key Words:** *Theileria ovis*. Extremadura. Spain. Medium pathogenicity. Serologic response. Buparvaquone.

### Resumen

Tras el hallazgo fortuito de *Theileria ovis* en ovinos esplenectomizados, realizamos un estudio morfológico y serológico por medio del test de inmunofluorescencia indirecta (IFI) con el fin de caracterizar esta especie. Además se estudian algunos parámetros que nos proporcionan información acerca de su poder patógeno e inmunógeno.

En función de los resultados clínicos y hematológicos obtenidos podemos catalogar a esta especie como de patogenicidad media, ya que apenas provoca reacción térmica en el hospedador debido a los escasos niveles de parasitemia que alcanza, lo cual produce leves descensos en el valor hematocrito. Este hecho se confirma cuando animales no esplenectomizados e infectados experimentalmente apenas manifestaron cambios en los parámetros estudiados.

El estado de portador crónico (premunidad) se confirmó tras la determinación de niveles de anticuerpos por IFI previamente a la esplenectomía y por la evidenciación del parásito en circulación una vez realizada ésta. Los títulos experimentan un ascenso paralelo a los niveles de parasitemia una vez efectuada la intervención quirúrgica.

Mientras el dipropionato de imidocarbarol fue ineficaz en el tratamiento, la buparvaquona consiguió reducir significativamente los niveles de parasitemia.

La presencia de *T. ovis* en Extremadura es confirmada, lo cual supone considerar a este agente como colaborador en la etiología de enfermedades anemizantes.

**Palabras Clave:** *Theileria ovis*. Extremadura. España. Patogenicidad media. Respuesta serológica. Buparvaquona.

**Introducción**

Dos especies de *Theileria*, *T. lestoquardi* (sin. *T. hirci*), Morel y Uilenberg, 1981, agente causal de teileriosis maligna en ovinos y caprinos y *T. ovis*, Rodhain, 1916, agente etiológico de teileriosis benigna en pequeños rumiantes, han sido identificadas en África, Asia y Europa (Levine<sup>7</sup>). En España tan sólo contamos con los datos aportados por Juste Jordan y col.<sup>6</sup> quienes realizan una identificación morfológica y en base a la patogenicidad, de *T. ovis* en la provincia de Álava.

En este estudio describimos el hallazgo accidental de *T. ovis* en ovinos esplenectomizados, su aislamiento, identificación morfológica y serológica por el método de inmunofluorescencia indirecta (IFI), y resultados obtenidos tras el estudio de determinados parámetros clínicos, parasitológicos, hemáticos y serológicos (IFI), observados durante el curso de la infección.

Este agente de patogenicidad media puede provocar un cuadro anémico no muy acentuado, al actuar independientemente, o bien, y asociado a *Babesia ovis*, agravar el severo proceso inducido por ésta (Habela y col.<sup>5</sup>). La coexistencia de estas dos especies coincide en nuestra región con una amplia distribución de *Rhipicephalus bursa* (Habela y col.<sup>4</sup>), vector potencial de *B. ovis* (Purnell<sup>13</sup>) y *T. ovis* (Neitz<sup>12</sup>), de ahí el interés en diferenciar ambas especies.

**Material y Métodos**

Dos ovinos adultos (macho y hembra) de raza Merina y procedentes de la misma explotación, iban a ser utilizados tras la

esplenectomización como productores de antígeno de *Babesia ovis* una vez comprobada su seronegatividad frente a esta especie.

Tras la intervención quirúrgica se detectó que ambos animales (1 y 2) aparecían como portadores crónicos de *Theileria ovis*, hecho que nos proporcionó el material objeto de este estudio.

Previamente a la esplenectomía y una vez efectuada ésta, se realizó exploración clínica con toma de temperatura rectal, extrayendo por punción yugular muestras de sangre, adicionadas de EDTA. Los niveles de parasitemia y el estudio morfológico de las formas intraeritrocitarias se realizó sobre extensiones sanguíneas teñidas por el método de Giemsa. Igualmente, por este método fueron teñidas las preparaciones realizadas a partir del material extraído por biopsias ganglionares (preescapular y parotídeo). El valor hematocrito se

Empleamos además dos ovinos hembras (3 y 4), no esplenectomizados, de 1 año de edad, de la misma raza y procedentes del animalario de nuestra Facultad, los cuales, tras la constatación de su seronegatividad frente a *T. ovis* por IFI, se infectaron vía endovenosa con 1,8x10<sup>8</sup> eritrocitos parasitados, vehiculados en 5 c.c. de sangre.

En todos los animales, la toma de datos clínicos y de muestras se efectuó tres veces por semana, iniciándose 15 días antes de la esplenectomía (1 y 2) y de la infección (3 y 4). Esta periodicidad se mantuvo durante dos meses y medio. Durante el mes siguiente el muestreo se realizó cada cinco días.

El antígeno autóctono se preparó a partir de sangre con una parasitemia del 3%. Los eritrocitos fueron lavados 3 veces en solución tampón fosfato (pH= 7.2), impresos en portaobjetos, fijados durante 10 minutos en acetona, introducidos en paquetes herméticos y congelados a -80°C hasta el momento de su uso.

Hemos empleado también antígeno de *Theileria ovis* (originaria de Turquía) y de *Babesia ovis* aislada en Extremadura (Habela y col.<sup>5</sup>) frente a los cuales se testaron los sueros problema, con el fin de realizar su caracterización.

Los sueros, obtenidos por centrifugación, fueron congelados a -30°C hasta su uso y testados desde la dilución 1/40 hasta su punto final. Títulos iguales o superiores a 1/160 fueron considerados positivos.

Hemos utilizado un conjugado anti-especie comercializado por Nordic Immunology (Tilburg, Holanda), a la dilución 1:80 en solución tampón fosfato (pH= 7.2).

Para la identificación serológica, así como para el estudio de la cinética de anticuerpos hemos seguido el método de Inmunofluorescencia Indirecta descrito por Burrige<sup>2</sup> y modificado por Uilenberg y col.<sup>15</sup>.

Con el fin de comprobar la eficacia del dipropionato de imidocarbarol contra *T. ovis*, realizamos un tratamiento con este producto (Imizol, Wellcome Portugal), empleando una dosis de 1 ml (120 mg) por vía intramuscular durante dos días consecutivos (39 y 40 días postesplenectomía).

Por último, señalar la utilización de

**Tabla 1**

Resultados correspondientes al animal número 1. (Valores medios agrupados ± error típico)

DÍAS POSTESPLENECT.	TEMPERATURA °C	PARASITEMIA %	HEMATOCRITO %	TÍTULOS (IFI) 1 / X
-14	39,20 ± 0,05	Negativo	40,60 ± 0,41	1/320
-7	39,26 ± 0,12	Negativo	39,63 ± 0,08	1/320
0	38,93 ± 0,17	Negativo	40,60 ± 0,63	1/160
7	39,13 ± 0,23	Negativo	35,60 ± 5,75	1/160
14	38,83 ± 0,20	Negativo	36,20 ± 1,12	1/160
21	38,76 ± 0,21	Negativo	37,70 ± 0,12	1/320
28	38,30 ± 0,08	< 0,1%	32,33 ± 0,88	1/320
35	38,60 ± 0,20	0,06 ± 0,03	28,70 ± 1,75	1/320
42*	38,83 ± 0,27	0,43 ± 0,03	29,23 ± 1,62	1/640
49	38,73 ± 0,23	2,36 ± 1,35	30,70 ± 0,65	1/1280
56	38,70 ± 0,25	4,06 ± 0,63	27,96 ± 0,54	1/1280
63**	38,60 ± 0,29	1,03 ± 0,90	24,48 ± 2,00	1/1280
70	38,40 ± 0,14	Negativo	27,23 ± 0,70	1/1280
80	38,90 ± 0,40	< 0,1%	28,50 ± 0,37	1/640
90	38,50 ± 0,05	< 0,1%	31,40 ± 0,58	1/320

(\* ) = Tratamiento con dipropionato de imidocarb.

(\*\* ) = Tratamiento con buparvaquona.

buparvaquona (Butalex, Coopers Animal Health), fármaco ensayado con éxito en el tratamiento de infecciones por *Theileria parva* y *T. annulata* (Mc Hardy y Wekesa<sup>10</sup>), el cual fue inoculado vía intramuscular, a una dosis/animal de 2,5 ml (125 mg) a los 63 días post-esplenectomía.

Previamente a este tratamiento se obtuvo antígeno vivo estabilizado, que fue criopreservado en nitrógeno líquido tras adicionar dimetil sulfóxido al 8% como crioprotector.

### Resultados

Las formas parasitarias intraeritrocitarias, observadas a partir de los 28 días postesplenectomía en un animal y a los 36 en el otro, se caracterizaron morfológi-

camente por ser en su gran mayoría anulares y ovals presentando en menor porcentaje formas de coma, siendo aún más escasas las formas en "Cruz de Malta" (Fig. 1). A este aislado de teilerias lo hemos denominado "Norba-88".

Las medidas del diámetro mayor en las formas anulares y ovals quedaron comprendidas entre 0,5-1,6  $\mu$ m. Todos los intentos realizados para evidenciar esquizontes en el material extraído de las biopsias ganglionares resultaron infructuosos. Los resultados obtenidos en los dos animales tras la exploración clínica y la analítica correspondiente quedan resumidos en las tablas 1 y 2, donde representamos valores medios agrupados.

Los máximos niveles de parasitemia apreciados alcanzaron porcentajes del  $4,06 \pm 0,63$  en el animal número 1; sin

Tabla 2

Resultados correspondientes al animal número 2.  
(Valores medios agrupados  $\pm$  error típico)

DÍAS POSTESPLENECT.	TEMPERATURA °C	PARASITEMIA %	HEMATOCRITO %	TÍTULOS (IFI) 1 / X
-14	38,86 $\pm$ 0,12	Negativo	44,03 $\pm$ 0,21	1/160
-7	38,90 $\pm$ 0,11	Negativo	40,60 $\pm$ 1,12	1/160
0	38,80 $\pm$ 0,17	Negativo	42,56 $\pm$ 0,52	1/160
7	39,43 $\pm$ 0,17	Negativo	41,36 $\pm$ 1,31	1/160
14	38,70 $\pm$ 0,00	Negativo	38,26 $\pm$ 0,44	1/320
21	39,16 $\pm$ 0,13	Negativo	31,36 $\pm$ 0,34	1/320
28	38,70 $\pm$ 0,27	Negativo	27,90 $\pm$ 0,65	1/320
35	38,75 $\pm$ 0,12	Negativo	27,44 $\pm$ 0,44	1/320
42*	39,90 $\pm$ 0,15	0,43 $\pm$ 0,16	29,37 $\pm$ 0,53	1/640
49	38,90 $\pm$ 0,51	0,36 $\pm$ 0,21	22,78 $\pm$ 2,44	1/1280
56	38,90 $\pm$ 0,39	0,36 $\pm$ 0,03	19,40 $\pm$ 1,25	1/1280
63**	38,60 $\pm$ 0,20	0,26 $\pm$ 0,16	22,13 $\pm$ 2,80	1/2560
70	39,20 $\pm$ 0,20	< 0,1%	24,53 $\pm$ 0,53	1/1280
80	38,80 $\pm$ 0,18	< 0,1%	25,53 $\pm$ 0,40	1/1280
90	39,10 $\pm$ 0,05	< 0,1%	28,36 $\pm$ 0,41	1/640

(\*) = Tratamiento con dipropionato de imidocarb.

(\*\*) = Tratamiento con buparvaquona.

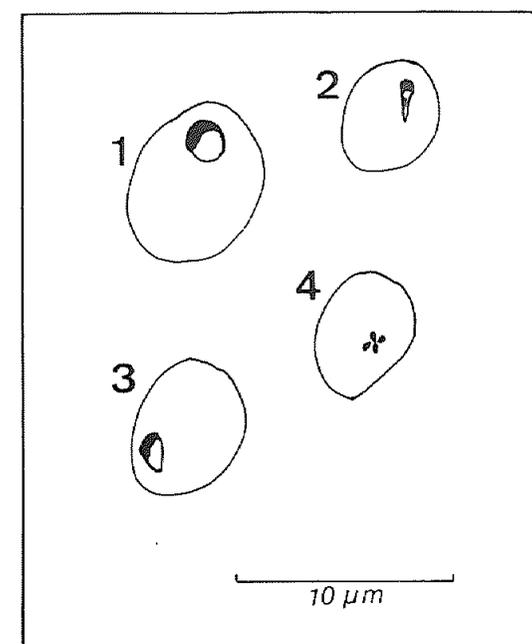


Fig. 1: Morfología de los merozoitos de *Theileria ovis* (Norba-88).

1. anular  
2. coma  
3. oval  
4. cruz de malta

embargo en éste en ningún momento se observó reacción térmica que hiciera sobrepasar la temperatura rectal de los límites considerados como fisiológicos.

Respecto al animal número dos los niveles de parasitemia detectados fueron inferiores, llegando a alcanzar máximos de  $0,433 \pm 0,16$ , momento en el cual la temperatura corporal superó en algunas décimas el rango fisiológico ( $39,9 \pm 0,15^\circ\text{C}$ ).

El valor hematocrito experimentó un descenso moderado en ambos animales, lo cual nos hace considerar a *Theileria ovis* como un agente de patogenicidad media, pudiendo colaborar con otros hemoparásitos en agravar la crisis hemolíticas.

Los valores hematocritos mínimos observados alcanzaron cifras de  $24,48 \pm 2$  en el animal 1, a los 63 días postesplenectomía, y de  $19,4 \pm 1,25$  en el animal 2 a

los 56 de realizada la intervención quirúrgica. En ningún momento apreciamos signos de reacción hematopoyética por lo que esta anemia de tipo medio fue calificada de normocítica y normocrómica. Los animales no esplenectomizados e inoculados intravenosamente mostraron una ligera reacción térmica ( $40,4 \pm 0,2$ ) a los 5-6 días postinoculación con niveles de parasitemia que no superaron el 0,1%, siendo imperceptibles en determinados días y definitivamente no observados a partir de los 18 días postinfección.

Mediante el empleo de la IFI, hemos comprobado la existencia de comunidad antigénica entre *Theileria ovis* identificada en Extremadura y *T. ovis* procedente de Turquía. Por otra parte, los sueros problemas no reaccionaron cuando fueron enfrentados al antígeno de *Babesia ovis* también originaria de nuestra región; este hecho pone de manifiesto la sensibilidad del test en la identificación serológica.

Es obvio que los animales empleados en este experimento mantenían un estado de premunidad ya que los títulos de anticuerpos frente a *T. ovis* fueron claramente positivos antes de la esplenectomía. El retorno del parásito a la circulación tras la intervención quirúrgica confirma este hecho.

Prácticamente a partir de la existencia de niveles de parasitemia detectables, la tasa de anticuerpos fluorescentes experimenta un ascenso progresivo que alcanza títulos máximos de 1/1.280-1/2.560 entre los días 56 y 63 postesplenectomía.

El tratamiento con buparvaquona resultó ser eficaz en la reducción de los niveles de parasitemia y, consiguientemente, en los títulos de anticuerpos fluorescentes. Sin embargo no fue capaz de esterilizar a los animales, ya que varios días post-tratamiento fueron observadas teilerias en el interior de los eritrocitos, aunque en escaso número, persistiendo títulos de anticuerpos hasta la conclusión del experi-

mento. El dipropionato de imidocarbarol se mostró ineficaz en el tratamiento de la teileriosis ovina.

### Discusión

Las características morfológicas de *T. ovis* (Norba-88) detectada en Extremadura coinciden con las descritas por Levine<sup>7</sup> para esta especie, siendo las medidas similares a las señaladas por este autor para *T. hirci*, especie morfológicamente indistinguible de *T. ovis* (Lewis y Purnell<sup>9</sup>). Sin embargo en ningún momento obtuvimos medidas de 4 µm de largo por 1,5 µm de ancho como las indicadas por Juste Jordan y col.<sup>6</sup> en *T. ovis* identificada en el País Vasco.

En los ganglios linfáticos preescapulares, a pesar de encontrarse aumentados de tamaño, fue imposible detectar esquizontes; este hecho también es descrito por Bhattacharyulu y col.<sup>1</sup> y Uilenberg y Schreuder<sup>16</sup>. Levine<sup>7</sup> señala la dificultad de observar cuerpos azules de Koch, los cuales han sido detectados únicamente tras búsquedas exhaustivas. Sin embargo en infecciones por *T. hirci*, los cuerpos de Koch son fácilmente detectables en ganglios linfáticos, bazo, hígado y riñones (Gautam y col.<sup>3</sup>). En infecciones experimentales por *Theileria annulata* la presencia de esquizontes fue observada únicamente cuando ésta se realizó a través de garrapatas (Uilenberg y col.<sup>14</sup>), de ahí que en los animales infectados intravenosamente también resultara infructuosa la búsqueda de esquizontes.

*Theileria ovis* se mostró como un parásito relativamente benigno, ya que tan sólo hemos apreciado una ligera reacción térmica a los 42 días postesplenectomía en uno de los animales y a los 5-6 días postinoculación en los dos animales no esplenectomizados. Lewis y Purnell<sup>9</sup> no observan una respuesta febril en los animales esplenectomizados e inoculados

experimentalmente. Nuestros resultados se aproximan más a los obtenidos por Bhattacharyulu y col.<sup>1</sup> quienes, tras esplenectomizar animales presumiblemente portadores de *T. ovis*, observan una ligera reacción térmica paralela a la aparición del parásito en sangre, apreciando también una anemia no muy acusada. Sin embargo, en infecciones por *T. hirci* se describe una sintomatología muy manifiesta y elevada mortalidad (Gautam y col.<sup>3</sup>).

Respecto a los niveles máximos de parasitemia observados después de la esplenectomía, se pueden considerar similares a los hallados por Bhattacharyulu y col.<sup>1</sup> en idénticas condiciones experimentales. En los animales no esplenectomizados la parasitemia no superó el 0,1%, hecho que coincide con las apreciaciones de Lewis y Purnell<sup>9</sup> quienes también observan niveles bajos de parasitemia en animales intactos.

Por medio del test de inmunofluorescencia indirecta hemos realizado la identificación serológica, apreciando comunidad antigénica entre nuestra cepa y una procedente de Turquía, hecho contrario a lo que ocurre entre cepas de *Babesia motasi* originarias de Turquía y Europa, donde se ha descrito sólo una inmunidad cruzada parcial (Uilenberg y col.<sup>15</sup>) o características serológicas diferentes (Lewis y col.<sup>8</sup>).

Los títulos máximos de anticuerpos fueron observados entre los días 56-63 postesplenectomía, datos coincidentes con los obtenidos por Uilenberg y Schreuder<sup>16</sup>, aunque éstos los detectan a partir de los 60 días de realizada la transmisión experimental con *Rhipicephalus evertsi*.

Mientras el dipropionato de imidocarbarol se mostró ineficaz en el tratamiento frente a *T. ovis*, la buparvaquona a la dosis utilizada contra *T. parva* y *T. annulata* (Mc Hardy y Wekesa<sup>10</sup>), es decir, 2,5 mg/kg peso vivo, redujo considerablemente los niveles de parasitemia aunque no eliminó totalmente el parásito del organismo.

### Referencias

- Bhattacharyulu, Y.; Shruti, D.; Gautam, O.P.; Malik, P.D.— Experimental transmission of theileriosis in sheep - A preliminary report. *HAU J. Res.*, 2 (3), 1972, 202-205.
- Burridge, M.J.— Application of the indirect fluorescent antibody test in experimental East Coast Fever (*Theileria parva* infection of cattle). *Res. Vet. Sci.*, 12, 1971, 338-341.
- Gautam, O.P.; Sisodia, R.S.; Jagdish, S.; Singh, D.K.— Theileriosis in sheep. *Harvana Vet.*, 14 (2), 1975, 94-100.
- Habela, M.; Navarrete, I.; Martínez-Gómez, F.; Reina, D.— Contribución al conocimiento de la parasitofauna de Cáceres. Primera relación. I. Protozoos y Artrópodos. *Rev. Ibér. Parasitol.*, Vol. Extra, 1987, 39-43.
- Habela, M.; Navarrete, I.; Reina, D.; Hernández-Rodríguez, S.— Aislamiento e identificación serológica de *Babesia ovis* en Extremadura (España). V Congreso Nacional de Parasitología, Salamanca, 29 de Septiembre-2 de Octubre, 1987.
- Juste-Jordan, R.A.; García-Pérez, A.L.; Povedano-Fernández, I.— Estudio experimental de algunos agentes patógenos transmitidos por garrapatas (*Babesia*, *Theileria*, *Cytoecetes* y *Anaplasma*) en ovejas del País Vasco. *Med. Vet.*, 3 (9), 1986, 431-436.
- Levine, N.D.— *Veterinary Protozoology*. 1.ª Ed., Iowa State University Press. Ames, 1985, 318-321.
- Lewis, D.; Holman, M.R.; Purnell, R.E.; Young, E.R.— Investigations on *Babesia motasi* isolated from Wales. *Res. Vet. Sci.*, 31, 1981, 239-243.
- Lewis, D.; Purnell, R.E.— The piroplasm *Theileria ovis* detected in sheep in South Wales. *Vet. Rec.*, 108, 1981, 56-57.
- Mc Hardy, N.; Wekesa, L.S.— Buparvaquone (BW 720C) a new anti-theilerial naphthoquinone: Its role in the therapy and prophylaxis of theileriosis. Immunizations against theileriosis in África. *Proceed. Joint Work shop, Nairobi (Kenia)*, 1-5 Oct. 1984, p. 88.
- Morel, P.C.; Uilenberg, G.— Sur la nomenclature de quelques *Theileria* (Sporozoa, Babesioidea) des ruminants domestiques. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 34 (2), 1981, 139-143.
- Neitz, W.O.— The experimental transmission of *Theileria ovis* by *Rhipicephalus evertsi mimeticus* and *R. bursa*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 39 (2), 1972, 83-86.
- Purnell, R.E.— *Babesiosis*. Academic Press, New York, 1981, 25-63.
- Uilenberg, G.; Franssen, F.F.J.; Perie, N.M.— Stage-specific antigenicity in *Theileria annulata*: a case report. *Vet. Quarterly*, 8 (1), 1986, 73-75.
- Uilenberg, G.; Rombach, M.C.; Perie, N.M.; Zwart, D.— Blood parasites of sheep in the Netherlands. II *Babesia motasi* (Sporozoa, Babesidae). *Vet. Quarterly*, 2 (1), 1980, 3-4.
- Uilenberg, G.; Schreuder, E.C.— Further studies on *Haematoxenus separatus* (Sporozoa, Theileriidae) of sheep in Tanzania. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 29 (2), 1976, 119-126.

(Recibido el 15 de diciembre de 1988; aceptado el 20 de junio de 1989).