

DETECCIÓN DE PIROPLASMAS EN GANADO VACUNO DE LA ISLA DE MENORCA MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES.

S. Almería, J. Castellá, D. Ferrer, O. Sparagano*.

Parasitología y enfermedades Parasitarias. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra 08193. Barcelona.

* Department of Agriculture, Newcastle Upon Tyne, UK.

INTRODUCCIÓN

Las piroplasmosis son enfermedades transmitidas mediante picadura de artrópodos que afectan a animales tanto domésticos como silvestres. Están producidas por especies de los géneros *Theileria* y *Babesia*, los cuales están ampliamente distribuidos por todo el mundo, siendo causa de importantes pérdidas productivas y de problemas en la salud animal. Además, algunas especies (*B. divergens*, *B. microti*) están involucradas en zoonosis (Sparagano, 1999).

La identificación basada en la observación microscópica de frotis sanguíneos es poco sensible y no permite la diferenciación de las especies involucradas en las infecciones, las cuales difieren en su poder patógeno. También las técnicas serológicas presentan inconvenientes debido a la aparición de reacciones cruzadas entre las especies que dificulta el diagnóstico (Papadopoulos et al., 1999). En la actualidad se han puesto a punto y se están empezando a utilizar técnicas más sensibles y específicas basadas en técnicas de biología molecular, como la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de PCR-hibridación entre las cuales la más recientemente descrita es la técnica de hibridación en línea inversa (RLB) (Gubbels et al., 1999).

La PCR presenta una alta sensibilidad y especificidad pero no permite la identificación conjunta de distintas especies. Por el contrario, la técnica RLB unida a una alta sensibilidad y especificidad permite la detección e identificación simultánea de una gran cantidad de patógenos, diferenciando también las especies no patógenas de *Theileria*. Además la técnica permite el estudio de 40 muestras diferentes a la vez.

En el presente estudio se identificaron las especies de los géneros *Theileria* y *Babesia* que parasitan al ganado vacuno en la isla de Menorca mediante RLB, permitiendo conocer la situación de estas parasitaciones en la isla y las especies involucradas en la parasitación.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Se muestrearon un total de 133 vacas adultas de producción lechera en tres periodos de estudio: 45 animales fueron muestreados en marzo, 40 en junio y 48 en octubre. La PCR se realizó a partir de DNA aislado de 200 µl de sangre entera mediante extracción por fenol-cloroformo. La técnica RLB utiliza un set de iniciadores para la ampliación de las regiones hipervariables V4 del gen del RNA ribosomal común a todas las especies de *Theileria* y *Babesia*. Uno de los iniciadores está marcado con biotina que marca los productos obtenidos en la reacción de PCR. Estos productos son posteriormente hibridados a una membrana en la cual, a su vez, están ligados de manera covalente oligonucleótidos específicos para cada especie a

analizar. Los oligonucleótidos empleados en el estudio fueron: *T.annulata*, *T. buffeli*, *T. velifera*, *T. taurotragi*, *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens* y *B. Major* (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencia de los iniciadores comunes a todas las especies de *Babesia-Theileria* y secuencia de los oligonucleótidos específicos frente *T. annulata*, *T. buffeli*, *T. velifera*, *T. taurotragi*, *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens* y *B. major* empleados en el estudio.

Iniciador RLB R	CTAAGAATTTACCTCTGACAGT
Iniciador RLB F	GACACAGGGAGGTAGTGACAAG
Oligonucleótido <i>T. annulata</i>	CCTCTGGGGTCTGTGCA
Oligonucleótido <i>T. buffeli</i>	GGCTTATTTTCGGWTTGATTTT
Oligonucleótido <i>T. taurotragi</i>	TCTTGGCACGTGGCTTTT
Oligonucleótido <i>T. velifera</i>	CCTATTCTCCTTTACGAGT
Oligonucleótido <i>B. bigemina</i>	CGTTTTTTCCCTTTTGTTGG
Oligonucleótido <i>B. bovis</i>	CAGGTTTCGCCTGTATAATTGAG
Oligonucleótido <i>B. divergens</i>	GTTAATATTGACTAATGTGCGAG
Oligonucleótido <i>B. major</i>	TCCGACTTTGGTTGGTGT

· Iniciador marcado con biotina
 ·· W indica una A ó una T.
 Todos los oligonucleótidos presentan un grupo amino en el extremo 5´

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la técnica RLB se detectó la existencia de 4 especies diferentes de piroplasmas en el ganado vacuno en la isla de Menorca: *T. annulata*, *T. buffeli*, *B. bigemina* y *B. bovis*. La parasitación por las especies de *Theileria*, especialmente *T. buffeli* fue muy elevada. De los 133 animales estudiados 119 (89,5%) estaban parasitados por *T. buffeli*, aunque esta especie es considerada como una *Theileria* apatógena. Sin embargo, la parasitación por *T. annulata*, responsable de la Theileriosis Mediterránea fue también muy importante, 82 animales (61,6%) presentaron esta parasitación. No hubo diferencias entre los tres periodos de muestreo realizados, 31 animales fueron positivos a *T. annulata* en marzo, 26 en junio y 25 en octubre, indicando que la situación de esta parasitosis en la isla es endémica.

La presencia de *B. bigemina* fue observada en 8 animales (6,0%) y la de *B. bovis* en 4 animales (3,0%). Solamente 4 animales (3,0%) en todo el estudio fueron negativos a la presencia de piroplasmas en sangre.

Setenta y tres animales estaban simultáneamente parasitados por *T.*

annulata y *T. buffeli* (54,9% de los animales), cuarenta y seis (34,6%) únicamente presentaron *T. buffeli* y nueve (6,8%) únicamente *T. annulata*. De todos los animales del estudio solamente 5 animales no presentaron ninguna especie de *Theileria*. Los animales parasitados por *B. bigemina* presentaron simultáneamente alguna especie de *Theileria*, mientras que de los animales parasitados por *B. bovis*, un único animal no presentó parasitación por ninguna especie de *Theileria*. Ninguno de los animales presentó las dos especies de *Babesia* conjuntamente.

En conclusión, el ganado vacuno de la isla de Menorca, presenta unas prevalencias de parasitación por piroplasmas muy elevadas, siendo especialmente importante la Theileriosis Mediterránea que presenta una situación endémica. La técnica RLB presentó una elevada sensibilidad y especificidad y permitió la detección e identificación simultánea de todas las especies de *Theileria* y *Babesia* existentes en la isla.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto AG 98-10897-C02-01 CYCIT.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Gubbels, J.M., de Vos, A.P., van der Weide, M., Viseras, J., Schouls, L.M., de Vries, E., Jongejan, F. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. J. Clin. Microb., 1782-1789. 1999.

Papadopoulos, B., Perié, N.M., Uilenberg, G. Piroplasms of domestic animals in the Macedonia region of Greece. 1. Serological cross reactions. Vet. Parasitol., 63: 41-56. 1999

Sparagano, O. Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species. J. Vet. Parasitol., 13 (2): 83-92. 1999.