



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

ESTUDIO DE PREVALENCIA DE BABESIA Y THEILERIA EN LA ESPECIE
EQUINA

PREVALENCE RESEARCH OF BABESIA AND THEILERIA IN THE EQUINE
SPECIE

Autor/es

María Serrano Prieto

Director/es

María Jesús Gracia Salinas

Facultad de Veterinaria

2019



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

ESTUDIO DE PREVALENCIA DE BABESIA Y THEILERIA EN LA ESPECIE
EQUINA

PREVALENCE RESEARCH OF BABESIA AND THEILERIA IN THE EQUINE
SPECIE

Autor/es

María Serrano Prieto

Director/es

María Jesús Gracia Salinas

Facultad de Veterinaria

2019

ÍNDICE

1. RESUMEN / SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Prevalencia	4
2.2. Ciclo biológico	8
2.3. Vector	10
2.4. Patogenia e Inmunidad	11
2.5. Cuadro clínico	12
2.6. Diagnóstico	13
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	15
4. METODOLOGÍA.....	16
4.1. Revisión bibliográfica	16
4.2. Estudio experimental	16
4.3. Análisis estadístico.....	20
5. RESULTADOS	21
6. DISCUSIÓN.....	25
7. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	27
8. VALORACIÓN PERSONAL Y AGRADECIMIENTOS	28
9. BIBLIOGRAFÍA.....	28

1. RESUMEN /SUMMARY

La piroplasmosis es un proceso parasitario producido por dos especies de protozoos intraeritrocitarios, *Babesia caballi* y *Theileria equi*, y transmitido por garrapatas. Tiene implicaciones clínicas y socioeconómicas, que abarcan desde los costes de tratamiento, pérdida de rendimiento o muerte de los animales, hasta restricciones en exportaciones y en la participación de eventos deportivos. Se trata además de una enfermedad de obligada notificación ante la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE).

Distribuida ampliamente por todo el mundo, tiene una mayor incidencia en áreas tropicales, subtropicales y climas templados. España es una zona endémica de piroplasmosis y los datos de prevalencia existentes son escasos. El objetivo de este trabajo es obtener datos de prevalencia de *B. caballi* y *T. equi* de la zona del norte peninsular.

Se han estudiado 50 muestras de sangre de animales obtenidas del matadero de Zaragoza, y procedentes de explotaciones cárnicas de la Cornisa Cantábrica y Pirineos. Los sueros se han analizado mediante la técnica serológica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), técnica recomendada por la OIE.

Los resultados reflejan un 50% de positividad para *B. caballi*, un 30% para *T. equi* y un 16% para las infecciones mixtas. Se trata de altas prevalencias, en especial la obtenida para *B. caballi*. La prevalencia de *B. caballi*, así como los títulos serológicos obtenidos en los animales parasitados por esta especie son superiores a los obtenidos con *T. equi*. Entre los distintos factores analizados, la edad es un factor que ha podido condicionar el resultado de seroprevalencia obtenido para ambos parásitos. Sin embargo, no se ha demostrado que el sexo o la aptitud hayan influido en la prevalencia obtenida en el presente estudio.

SUMMARY

Piroplasmosis is a parasitic process produced by two species of intraerythrocyte protozoa, *Babesia caballi* and *Theileria equi*, and transmitted by ticks. It has clinical and socio-economic implications, ranging from treatment costs, loss of performance or death of animals, to restrictions on exports and participation in sporting events. It is also a notifiable disease to the World Organisation for Animal Health (OIE).

Estudio de prevalencia de *Babesia* y *Theileria* en la especie equina.

Widely distributed throughout the world, it has a higher incidence in tropical, subtropical and temperate climates. Spain is an endemic zone of piroplasmosis and existing prevalence data are scarce. The objective of this work is to obtain prevalence data for *B. caballi* and *T. equi* from the northern peninsular area.

Fifty blood samples from animals obtained from the Zaragoza slaughterhouse and from meat farms in the Cantabrian Coast and the Pyrenees have been studied. The sera were analysed using the serological technique of indirect immunofluorescence (IFAT), a technique recommended by the OIE.

The results reflect 50% positivity for *B. caballi*, 30% for *T. equi* and 16% for mixed infections. These are high prevalences, especially that obtained for *B. caballi*. The prevalence of *B. caballi*, as well as the serological titres obtained in animals parasitized by this species are higher than those obtained with *T. equi*. Among the different factors analyzed, age is a factor that may have conditioned the seroprevalence result obtained for both parasites. However, it has not been demonstrated that sex or aptitude have influenced the prevalence obtained in this study.

2. INTRODUCCIÓN

La piroplasmosis es un proceso parasitario producido por dos especies de protozoos intraeritrocitarios, *Babesia caballi* y *Theileria equi*, y transmitido por garrapatas. Puede afectar a caballos, mulas, burros y cebras (de Waal, 1992). Esta enfermedad también es conocida como malaria equina, fiebre biliar equina, babesiosis equina y theileriosis equina (Mehlhorn and Schein, 1998).

Las pérdidas económicas asociadas a la piroplasmosis son significativas, incluyen el coste del tratamiento, abortos, pérdida de rendimiento deportivo, muerte en algunos casos, restricciones en la participación en eventos deportivos ecuestres y limitaciones en la exportación de animales a países libres de la enfermedad (Kerber, 1999). Esto tiene una importancia especial en el caso de España debido a que un gran número de caballos (muchos de ellos Pura Raza Español) son exportados a países libres de piroplasmosis, por lo tanto, las altas prevalencias de la enfermedad dificultan la venta de estos animales al extranjero (Real Federación Hípica Española, 2013).

Estudio de prevalencia de *Babesia* y *Theileria* en la especie equina.

Los protozoos de los géneros *Babesia* y *Theileria* pertenecen a la familia Babesidae y Theileridae respectivamente, y ambos forman parte del orden Piroplasmida. No existe inmunidad cruzada entre *B. caballi* y *T. equi* (Maurer, 1962), aunque algunos autores señalan que un animal infectado por *B. caballi*, genera inmunidad frente a *T. equi*, pero si por el contrario, se infecta por *T. equi*, no presenta inmunidad frente a *B. caballi* (Taylor *et al.*, 2013).

Los animales infectados por *T. equi* permanecen seropositivos de por vida, independientemente de si los signos clínicos se resuelven naturalmente o en respuesta al tratamiento farmacológico. Por otro lado, los infectados por *B. caballi* se mantienen seropositivos hasta 4 años tras la infección (de Waal, 1992).

Los parásitos son transmitidos principalmente por garrapatas de la familia Ixodidae, aunque se han observado casos en los que la transmisión se produce de forma mecánica por medio de agujas contaminadas o por vía sexual, en el caso de semen contaminado. También se ha descrito la transmisión transplacentaria en infecciones causadas por *T. equi* (Georges *et al.*, 2011).

La piroplasmosis es una enfermedad de obligada notificación ante la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE), y los veterinarios que detecten un caso deben seguir las pautas nacionales y/o locales para la notificación. Para el diagnóstico, se recomienda realizar las pruebas laboratoriales reflejadas en el Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE (Center for Food Security & Public Health, 2008). Otro de los aspectos importantes a tener en cuenta es que puede suponer un problema de salud pública. Esto se debe a que algunas especies de *Babesia* y *Theileria* ocasionalmente pueden infectar especies distintas a las de su huésped natural, incluidos los humanos. Hasta el momento, los patógenos con mayor importancia para los humanos son los bovinos (*B. divergens*) en Europa y las especies de roedores (*B. microti*) en EEUU. A pesar de que la babesiosis humana no está completamente descrita y no se considera una zoonosis de mayor importancia, es posible que *B. caballi* y *T. equi* hayan estado involucradas en algunas infecciones en seres humanos (Center for Food Security & Public Health, 2008).

2.1. Prevalencia

La distribución de este proceso está ligada por lo tanto, a la presencia del vector y aunque se han descrito casos clínicos de piroplasmosis en todos los continentes, la enfermedad es endémica en áreas tropicales, subtropicales y en zonas templadas, entre las que se encuentra

Estudio de prevalencia de *Babesia* y *Theileria* en la especie equina.

España (Brüning, 1996). En la Tabla 1 se presentan distintos estudios en los que se recogen datos de prevalencia a nivel mundial.

Tabla 1. Datos de prevalencia de *B. caballi* y *T. equi*.

País	Técnica diagnóstica (*)	<i>B. caballi</i>	<i>T. equi</i>	Referencias
Portugal	ELISA	11,7%	19,1%	(Ribeiro <i>et al.</i> , 2013)
Francia	PCR	1,2%	80%	(Fritz, 2010)
Italia	IFI	1,9%	32,2%	(Sgorbini <i>et al.</i> , 2015)
	ELISA	8,9%	39,8%	(Bartolomé Del Pino <i>et al.</i> , 2016)
	PCR	10,3%	70,3%	(Bartolomé Del Pino <i>et al.</i> , 2016)
Grecia	ELISA	1,1%	9,2%	(Kouam <i>et al.</i> , 2010)
Holanda	IFI	3%	1%	(Butler <i>et al.</i> , 2012)
	PCR	-	1,6%	(Butler <i>et al.</i> , 2012)
Suiza	IFI	1,5%	4,4%	(Sigg <i>et al.</i> , 2010)
Turquía	IFI	9,6%	12,8%	(Karatepe <i>et al.</i> , 2009)
	ELISA	0%	56,8%	(Kurt and Yaman, 2012)
	PCR	0%	8,8%	(Güven <i>et al.</i> , 2017)
Egipto	IFI	17%	23,9%	(Mahmoud <i>et al.</i> , 2016)
	ELISA	0%	14,8%	(Mahmoud <i>et al.</i> , 2016)
	PCR	19,3%	36,4%	(Mahmoud <i>et al.</i> , 2016)
Brasil	IFI	83%	91%	(Heim <i>et al.</i> , 2007)
	ELISA	69,2%	78,3%	(Vieira <i>et al.</i> , 2013)
	PCR	12,5%	59,7%	(Heim <i>et al.</i> , 2007)
Méjico	IFI	27,4%	45,2%	(Cantú-Martínez <i>et al.</i> , 2012)
Venezuela	ELISA	23,2%	14%	(Rosales <i>et al.</i> , 2013)
	PCR	4,4%	61,8%	(Rosales <i>et al.</i> , 2013)
China	ELISA	51,16%	11,51%	(Wang <i>et al.</i> , 2014)
India	ELISA	1,11%	75%	(Sumbria <i>et al.</i> , 2016)

(*) IFI: Inmunofluorescencia indirecta, ELISA: Enzimoimmunoanálisis y PCR: Técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

Como se puede observar en la tabla, se aportan valores muy variables entre países y estudios realizados. En general, la prevalencia obtenida para *T. equi* es superior a la obtenida para *B. caballi*, en especial en los estudios realizados en Francia, en Italia y en la India. Los estudios se han realizado mediante las técnicas diagnósticas IFI, ELISA como pruebas indirectas y PCR como prueba directa. En general, utilizando la técnica de IFI, los resultados son ligeramente superiores.

En España, hay estudios que recogen la prevalencia del proceso en las zonas centrales, del suroeste y del noroeste de la península.

De forma global, sin especificación de regiones, hay tres estudios que dan datos de prevalencias en todo el territorio español. Establecen una seroprevalencia del 20,74% y del

Estudio de prevalencia de *Babesia* y *Theileria* en la especie equina.

44,55% para *B. caballi* y para *T. equi* respectivamente (Montes Cortés *et al.*, 2017). Otros autores obtienen unos resultados del 4,6% para *B. caballi* y del 22,6% para *T. equi* (Camino *et al.*, 2018). Recientemente otro estudio señala que las prevalencias son del 29,4% y del 66% para *B. caballi* y para *T. equi* respectivamente (Montes Cortés *et al.*, 2019).

En la zona **central** del territorio nacional, existen datos de Madrid, Castilla la Mancha y Castilla y León. En Madrid, hay dos estudios que han establecido prevalencias de ambos parásitos. Los resultados no difieren mucho de un estudio a otro, la seroprevalencia es de un 14,1% para *B. caballi*, 32,37% para *T. equi* y 8,33% para las infecciones mixtas (Montes Cortés *et al.*, 2017), mientras que el otro estudio más reciente da unos resultados del 4,6% para *B. caballi*, del 22,6% para *T. equi* y del 2% para la infección de ambos parásitos simultáneamente (Camino *et al.*, 2018). En la comunidad autónoma de Castilla-La Mancha, las prevalencias encontradas son del 20,68% para *B. caballi*, del 62,57% para *T. equi* y del 15,71% para las infecciones mixtas (Montes Cortés *et al.*, 2017). Atendiendo a la comunidad de Castilla-León, la seropositividad del 31,16% para *B. caballi*, del 38,84% para *T. equi* y del 16,38% para las infecciones mixtas (Montes Cortés *et al.*, 2017).

En el **suroeste** de la península, en concreto en Extremadura, la prevalencia es de un 12,2% de positividad para *B. caballi*, de un 46,85% para *T. equi* y de un 7,48% para las infecciones mixtas (Montes Cortés *et al.*, 2017). En la comunidad de Andalucía se pueden encontrar dos estudios, el primero de ellos obtiene una positividad del 11,4% de para *B. caballi*, del 50,3% para *T. equi* y del 8,4% para las infecciones mixtas (García-Bocanegra *et al.*, 2013). En el estudio más reciente, los resultados son de un 22,22% para *B. caballi*, de un 43,61% para *T. equi* y de un 14,88% para la coinfección de ambas especies (Montes Cortés *et al.*, 2017)

En la zona **noroeste** peninsular, concretamente en la comunidad de Galicia, un estudio realizado en 2005 determina que la prevalencia de *B. caballi* es del 28,3% y que la de *T. equi* del 40%, mientras las infecciones mixtas reflejan un 20% (Camacho *et al.*, 2005).

De forma común a todas las regiones, se observa que el parásito más frecuente es *T. equi*, mientras que la prevalencia de *B. caballi* es de aproximadamente la mitad. La comunidad con una mayor positividad para *B. caballi* es Castilla-León con un 31,16%, mientras que la comunidad con la mayor prevalencia de *T. equi* es Castilla-La Mancha con un 62,57%. Por otro lado, aquella en la que las infecciones mixtas son más comunes es Galicia, con un 20%.

Estudio de prevalencia de *Babesia* y *Theileria* en la especie equina.

En las Figuras 1, 2 y 3 se presentan datos de prevalencias de *B. caballi*, *T. equi* e infecciones mixtas por comunidades asociados a una gama de colores para cada una de las especies y para la infección mixta. Se observa en ellas como las zonas del norte, noreste, este e islas Baleares y Canarias aparecen sin datos debido a que no se han encontrado estudios realizados en dichas regiones.

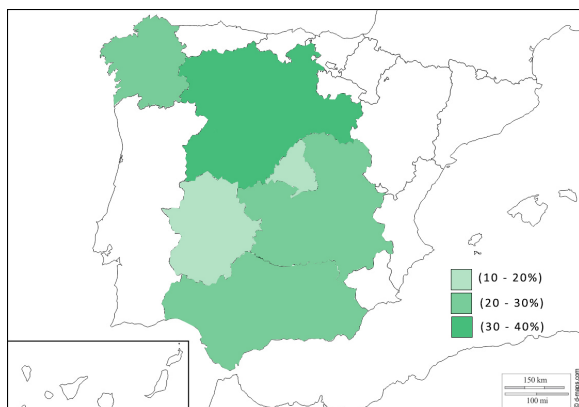


Figura 1. Prevalencia de *B. caballi* por comunidades autónomas.

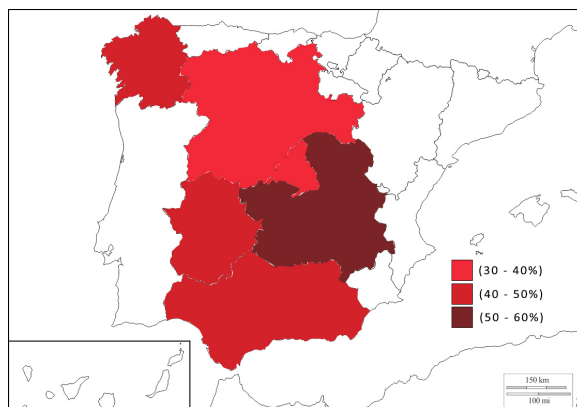


Figura 2. Prevalencia de *T. equi* por comunidades autónomas.

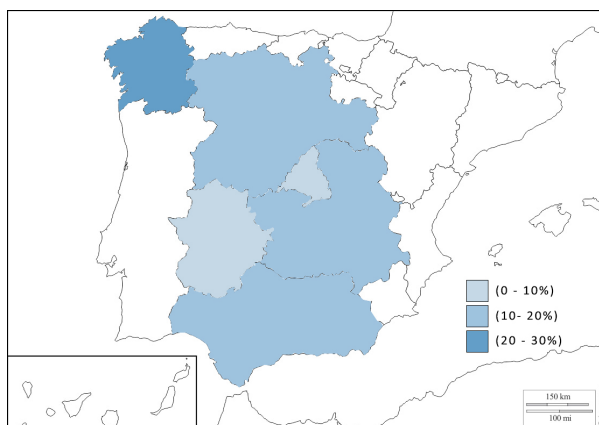


Figura 3. Prevalencia de *B. caballi* y *T. equi* conjuntamente por comunidades autónomas.

2.2. Ciclo biológico

El ciclo biológico de ambos parásitos incluye distintas fases que se desarrollan tanto en el hospedador como en la garrapata (Wise *et al.*, 2013). La infección del hospedador comienza con la entrada del parásito en forma de esporozoitos a través de la saliva de la garrapata, si éstos pertenecen al género *Theileria*, invaden de forma prioritaria monocitos y linfocitos (PBMCs) antes que eritrocitos (Shaw, 2003), en cambio, si los esporozoitos son del género *Babesia* se dirigirán exclusivamente a los eritrocitos.

En el caso de *Babesia* (Figura 4), el ciclo continua con la transformación de los esporozoitos a trofozoitos y la multiplicación asexual de estos trofozoitos dentro de los eritrocitos por medio de fisión binaria dando lugar a dos cuerpos piriformes; merozoitos (Rothschild, 2013). Los merozoitos miden aproximadamente de 2 a 5µm de largo y de 1,3 a 3µm de diámetro (Lapage, 1981). Tras la lisis del eritrocito, los merozoitos se liberan e invaden otros eritrocitos (Wise *et al.*, 2013).

En *Theileria* (Figura 5), los esporozoitos pasan a considerarse trofozoitos y parasitan las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), en ellas se produce primero la multiplicación asexual mediante esquizogonia, dando lugar a macro y microesquizontes. En un periodo aproximado de 9 días, los merozoitos se liberan de las PBMCs para invadir los eritrocitos (Mehlhorn and Schein, 1998). Los merozoitos de *Theileria* se dividen en los eritrocitos y forman cuatro cuerpos con forma de pera de 2µm de longitud que se conocen como "Cruz de Malta"(Knowles, 1996). De igual manera que en el ciclo de *Babesia*, provocan la lisis celular, se liberan e invaden nuevos eritrocitos (Wise *et al.*, 2013).

Cuando una garrapata se alimenta de la sangre del animal parasitado, ingiere eritrocitos infectados con merozoitos. Algunos de éstos son destruidos en el intestino de la garrapata, pero otros sobreviven y forman cuerpos redondos que serán capaces de introducirse en las células epiteliales del intestino de la garrapata (Ueti and Knowles, 2018). Una vez en el intestino se produce la gametogénesis, que se trata de la fase de reproducción sexual del parásito, y se forman los cigotos. Los cigotos sufren una serie de cambios morfológicos dando lugar a los kinetos (Mehlhorn and Schein, 1993).

Los kinetos se liberan de las células epiteliales y viajan por el torrente hemolinfático de la garrapata, en el caso de *Babesia*, invaden los ovarios y las glándulas salivares donde se

Estudio de prevalencia de *Babesia* y *Theileria* en la especie equina.

produce la esporogonia, fase en la que los kinetos maduran a esporozoitos (Mosqueda *et al.*, 2004). Una característica exclusiva de *Babesia* frente a *Theileria* es que el parásito puede transmitirse de forma transovárica a la larva de la garrapata mediante la invasión de las células ováricas de ésta (Mehlhorn and Schein, 1993).

En el caso de *Theileria*, los kinetos migran directamente a las glándulas salivares y allí se produce su transformación a esporozoitos. Al no invadir ningún otro tejido del organismo de la garrapata, no hay transmisión transovárica (Mehlhorn and Schein, 1993), aunque de forma experimental, se ha conseguido demostrar este tipo de transmisión (Ikadai *et al.*, 2007).

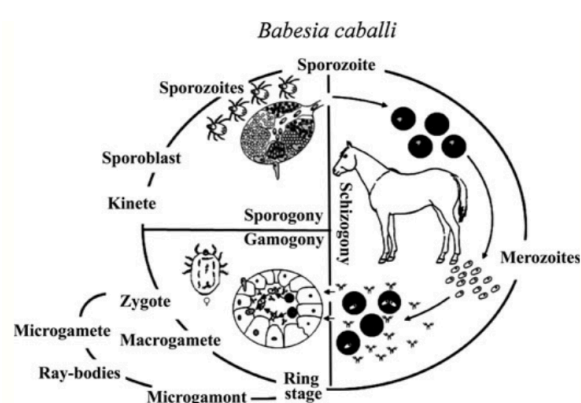


Figura 4. Ciclo biológico de *B. caballi* (Ueti and Knowles, 2018).

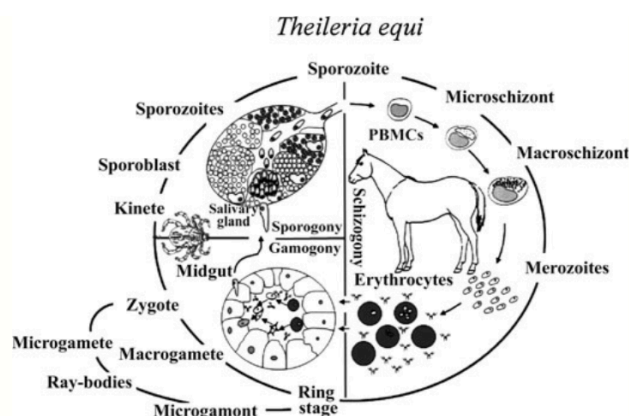


Figura 5. Ciclo biológico de *T. equi* (Ueti and Knowles, 2018).

Se puede concluir que las diferencias en los ciclos biológicos de cada parásito pueden afectar a su transmisión. Dentro de la garrapata, el parásito de *Babesia* tiene la capacidad de multiplicarse invadiendo muchos órganos, incluidos los ovarios, pasando fácilmente a la próxima generación de garrapatas y permitiendo que esta nueva generación tenga capacidad

de infectar. Por otro lado, la transmisión transovárica de *Theileria* es incierta (Center for Food Security & Public Health, 2008), es decir, este tipo de transmisión ocurre, pero no está descrita su relación ni su importancia epidemiológica (Moltmann *et al.*, 1983; Ikadai *et al.*, 2007).

2.3. Vector

Las garrapatas se pueden clasificar en garrapatas duras: Ixodidae, y garrapatas blandas: Argasidae. Aquellas del género Ixodidae son las que actúan como vectores naturales de *B. caballi* y *T. equi*. Se trata de garrapatas relativamente grandes, de hasta 2cm y aplanadas dorsoventralmente. Son parásitos de forma temporal y permanecen periodos cortos de tiempo en la hospedador (Taylor *et al.*, 2013).

El ciclo biológico de las garrapatas incluye cuatro fases: huevo, larva, ninfa y adulto. En cada estadio activo, la garrapata busca a un hospedador, se alimenta y cae al suelo para llevar a cabo el desarrollo al estadio siguiente (Estrada-Peña, 2015). En la fase reproductiva adulta, se diferencian en hembra y macho (Taylor *et al.*, 2013), la hembra se alimenta de un único hospedador y lo hace muy lentamente en un periodo de tiempo que puede durar de 6 a 9 días, pudiendo ingerir hasta 100 veces su peso en sangre (Anderson and Magnarelli, 2008). Los machos ingieren una pequeña cantidad de sangre, la suficiente para completar la espermatogénesis (Estrada-Peña, 2015) y en ocasiones son capaces de cambiar de un hospedador a otro con la finalidad de aumentar la probabilidad de encontrarse con hembras (Mason and Norval, 1981).

Existen tres patrones diferentes de alimentación, que varían en función del número de hospedadores utilizados como fuente de alimento durante su ciclo biológico. Dependiendo de la especie a la que pertenezcan, presentan un patrón u otro: garrapatas de uno, de dos y de tres hospedadores (Polanco and Rios, 2016). Las garrapatas de un hospedador o de ciclo monoxeno, desarrollan todas sus fases o estadios en el mismo hospedador, las garrapatas de dos hospedadores o de ciclo dixeno realizan la primera muda sobre el mismo hospedador y caen el suelo para una vez siendo adultas, buscar un nuevo hospedador, y por último, las garrapatas de tres hospedadores o de ciclo trixeno, caen el suelo tras cada alimentación para mudar y buscar nuevos hospedadores (Márquez-Jiménez *et al.*, 2005).

Existen tres formas diferentes de transmisión: intraestadial, transestadial y transovárica. La transmisión intraestadial ocurre en el caso de los machos, cuando la adquisición y la transmisión del parásito por parte de la garrapata suceden en una misma fase de su ciclo

biológico, en la que el macho de la garrapata es capaz de parasitar a varios animales. La transmisión transtadial consiste en la adquisición del parásito en una fase de su ciclo, pero la incapacidad de su transmisión hasta no haber alcanzado la fase subsecuente de él. Y por último, la transmisión transovárica, que como ya se ha comentado, se produce cuando la hembra adquiere el parásito y éste se multiplica en sus ovarios, pasando así a la siguiente generación (Guimarães *et al.*, 1998; Ueti *et al.*, 2008). *B. caballi* es transmitida transovaricamente y transtadialmente por sus vectores, mientras que *T. equi* es transmitida intraestadialmente y transtadialmente (Ueti *et al.*, 2008).

En Europa, *B. caballi* se transmite principalmente por garrapatas del género *Dermacentor*, y *T. equi* por garrapatas de los géneros *Rhipicephalus* y *Hyalomma*. Existen 15 especies diferentes capaces de transmitir *B. caballi* y 14 especies capaces de transmitir *T. equi* (Stiller *et al.*, 2002). Las especies presentes en España son *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus turanicus*, *Hyalomma marginatum* e *Hyalomma lusitanicum* (Iori *et al.*, 2010).

2.4. Patogenia e Inmunidad

Durante la parasitemia se producen alteraciones en el contenido lipídico y proteico, el aumento del malondialdehído (marcador de la peroxidación lipídica) y el aumento de la concentración de iones oxidativos. Todo esto debilita la membrana del eritrocito y favorece la hemólisis (Ambawat *et al.*, 1999). Como consecuencia de la hemólisis puede producirse hemoglobinuria en casos de infecciones severas por *T. equi*, de la misma forma que la anemia extrema también es más común en este tipo de infecciones. También la ictericia se produce a causa de la hemólisis (Ambawat *et al.*, 1999). En el caso de *B. caballi*, la aglomeración de eritrocitos parasitados puede dar lugar al colapso de los capilares (Rothschild, 2013). En conjunto, la trombocitopenia y la respuesta del sistema inflamatorio, producen daños endoteliales y favorecen que se produzca coagulación intravascular diseminada (CID) (Ambawat *et al.*, 1999).

La transmisión transplacentaria de hembras infectadas al feto está descrita en *T. equi* (Allsopp *et al.*, 2007), mientras que en *B. caballi* solo existe la sospecha (Sant *et al.*, 2016). Esta transmisión puede dar lugar a abortos (más comúnmente si la infección se da en gestación tardía), mortinatos o infección neonatal (Wise *et al.*, 2013), aunque no todos los potros hijos de madres infectadas nacen infectados (Erbsloh, 1975)

Estudio de prevalencia de *Babesia* y *Theileria* en la especie equina.

El bazo desempeña un papel importante en la eliminación de los parásitos, aquellos animales con bazos sanos controlan la infección de forma más eficaz. Pero a pesar de que su participación es importante, el bazo y la inmunidad innata en ausencia de inmunidad adaptativa son incapaces de dar protección frente al proceso. En una infección experimental con *T. equi* de potros con bazos sanos pero con inmunodeficiencia combinada grave, éstos eran incapaces de controlar la enfermedad debido a la ausencia de linfocitos T y B maduros, lo que dificulta la respuesta inmune específica frente al antígeno, tanto humoral como celular (Knowles *et al.*, 1994).

Los anticuerpos específicos se pueden detectar a partir de los 7-11 días después de la infección, y alcanzan los valores más elevados entre los 30 y 45 días (Wise *et al.*, 2013), pero a pesar de que la respuesta humoral que se produce es considerable, los anticuerpos son insuficientes para una protección completa frente a la piroplasmosis (Donnelly *et al.*, 1982). Teniendo en cuenta la importancia de la respuesta celular en otros procesos protozoarios, se espera que ésta juegue un papel importante en la defensa contra *B. caballi* y *T. equi* (Brown, 2001).

En zonas endémicas, los potros reciben anticuerpos maternos con el calostro que pueden mantenerse hasta los cuatro o cinco meses de edad (Donnelly *et al.*, 1982). Éstos, les confieren protección durante este periodo, por lo que los potros nacidos en estas áreas solo suelen presentar infecciones subclínicas, ya que la inmunidad materna se sustituye gradualmente por una inmunidad activa y estable debido a la continua presencia del parásito (Phipps, 2010). En el momento en el que se introducen animales que no han tenido contacto previo con la enfermedad en zonas endémicas, el rango de mortalidad supera el 50% (Rothschild, 2013).

El periodo de incubación para la piroplasmosis es de 12 a 19 días cuando es causada por *T. equi*, y de 10 a 30 días cuando es causada por *B. caballi* (de Waal, 1992).

2.5. Cuadro clínico

Existen cuatro formas de presentación: hiperaguda, aguda, subaguda y crónica, siendo la forma aguda la más fácil de diagnosticar. Los signos clínicos asociados a la infección por *B. caballi* y a la infección por *T. equi* son similares, pero por lo general, es más grave la infección por *T. equi* que por *B. caballi* (Bartolomé del Pino, 2017).

La forma hiperaguda es poco frecuente y los caballos aparecen muertos o moribundos de forma repentina, se da sobre todo en infecciones por *T. equi* (Center for Food Security & Public Health, 2008).

En la infección aguda, se produce fiebre que suele aparecer por encima de los 40°C, disminución del apetito, malestar, aumento de las frecuencias cardiacas y respiratorias, congestión de mucosas, deshidratación, edema de las extremidades, ictericia y hemoglobinuria/bilirubinuria (más frecuente en infecciones por *T. equi*) (de Waal, 1992; Zobba *et al.*, 2008).

En los casos subagudos, los signos son semejantes pero la fiebre suele ser intermitente. Las mucosas varían de color pálido a rosa o a amarillo, con presencia de petequias y/o equimosis. También pueden aparecer signos de cólico leve (Zobba *et al.*, 2008). Los animales suelen presentar esplenomegalia que puede detectarse por palpación transrectal (de Waal, 1992).

En los casos crónicos se pueden apreciar pérdida de apetito, disminución de peso y bajo rendimiento (Zobba *et al.*, 2008), pero de forma muy inespecífica.

2.6. Diagnóstico

El diagnóstico clínico de esta enfermedad es difícil ya que los signos clínicos asociados son muy inespecíficos y es fácil confundirse con otros trastornos (World Organisation for Animal Health, 2018), pero pueden hacernos sospechar aquellos animales con fiebre, ictericia y anemia (Bartolomé del Pino, 2017).

Las técnicas laboratoriales para el diagnóstico de la piroplasmosis que son contempladas por la OIE están recogidas en el Manual Terrestre para la OIE, Capítulo 3.5.8. Se pueden clasificar en dos grandes grupos: pruebas de identificación del agente y pruebas de detección de la respuesta inmunitaria (World Organisation for Animal Health, 2018).

La identificación del agente se puede realizar mediante dos pruebas laboratoriales directas; el examen al microscopio y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El primero de ellos consiste en la identificación del parásito en frotis teñidos de sangre o de órganos, sin embargo, si la parasitemia es muy baja resulta difícil de detectar y únicamente es útil en la fase aguda de la infección (Friedhoff and Soulé, 1996). A veces es necesaria una detección exacta del agente por lo que este método no es el más recomendado para el diagnóstico (World Organisation for Animal Health, 2018).

Estudio de prevalencia de *Babesia* y *Theileria* en la especie equina.

Se han descrito técnicas moleculares para la detección de ambos agentes. La PCR consiste en la amplificación y detección de fragmentos específicos de DNA para determinar la presencia del parásito (Wise *et al.*, 2013). Es específica de especie y va dirigida al gen de la subunidad 18s de rARN (Criado-Fornelio *et al.*, 2003). Presenta una mayor sensibilidad, especificidad y utilidad que otros métodos (Böse *et al.*, 1995), siendo una técnica diagnóstica recomendada por la OIE (World Organisation for Animal Health, 2018).

Las pruebas de detección de la respuesta inmunitaria están recomendadas para el diagnóstico de esta enfermedad, en especial cuando los caballos se destinan a la exportación a países donde no se presenta la enfermedad pero si el vector. Las tres técnicas serológicas más utilizadas son la fijación de complemento (FC), la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el enzimoimmunoanálisis (ELISA) (World Organisation for Animal Health, 2018).

La FC se ha utilizado en el pasado para certificar caballos de importación, y en algunas regiones se sigue utilizando. El fundamento de la técnica es hacer reaccionar proteínas séricas (complemento) con complejos antígeno-anticuerpo para provocar la lisis celular. Requiere en primer lugar de la desnaturalización del complemento natural de los sueros a utilizar y la titulación del complemento. Después, se incuba el antígeno, el complemento y el suero diluido, y una vez incubado, se añade el sistema hemolítico y se incuba de nuevo en agitación. Tras la centrifugación de las placas, se considera positivo una lisis del 50%. Es una prueba exacta sólo para la detección de infecciones agudas y puede dar falsos negativos, especialmente si los animales han recibido tratamiento farmacológico, si generan reacciones anti-complementarias o por la incapacidad de las inmunoglobulinas de fijar el complemento. El antígeno se obtiene por la infección experimental en caballos por lo que plantea dudas relativas al bienestar animal (World Organisation for Animal Health, 2018).

La técnica IFI presenta mayor sensibilidad que la fijación de complemento y está recomendada como técnica diagnóstica para la piroplasmosis por la OIE (World Organisation for Animal Health, 2018), es una técnica utilizada en un elevado número de estudios. El fundamento de la técnica consiste en hacer reaccionar el suero problema con placas antigenadas, los anticuerpos unidos serán visibles tras la adición de un conjugado anti-equino marcado con fluoresceína. Se consideran positivos si muestran fluorescencia en una dilución 1:80 o superior (Brüning, 1996). Tiene como ventaja la capacidad de distinguir entre infecciones causadas por *B. caballi* y por *T. equi*, pero el problema que presenta esta técnica es

que para aumentar la especificidad es necesario diluir los sueros, con lo que se pierde sensibilidad (World Organisation for Animal Health, 2018).

La técnica ELISA es muy sensible, especialmente para *T. equi* (Knowles *et al.*, 1992). Sobre una placa antigenada, se añaden los sueros a estudiar, formándose uniones antígeno-anticuerpo. Posteriormente, se añade un conjugado que en el caso de ELISA se trata de anticuerpos unidos a enzimas. Si se ha generado una primera unión antígeno-anticuerpo, el conjugado se asocia a ella y al añadir el sustrato de la enzima, se produce una reacción que cambia el color. Se han producido proteínas recombinantes de *T. equi* (EMA-1; EMA-2) y de *B. caballi* (RAP-1; Bc48) en *E. coli*. (Huang *et al.*, 2003) con lo que se evita parasitar a los caballos para la producción de antígenos, tiene como desventaja que el uso de anticuerpos secundarios puede dar lugar a reactividad cruzada. También es una técnica recomendada por la OIE (World Organisation for Animal Health, 2018).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La piroplasmosis es un proceso con implicaciones clínicas y socioeconómicas. En el aspecto clínico se señalan los costes de tratamiento, la pérdida de rendimiento, los abortos y la muerte de los animales, y en el aspecto socioeconómico se encuentran las restricciones en las exportaciones y en la participación de animales en eventos deportivos (Kerber, 1999).

Es un proceso endémico de zonas de climas tropicales, subtropicales y templados (Brüning, 1996). Solo unos pocos países en el mundo están libres de infecciones autóctonas por *B. caballi* y *T. equi*, y se estima que únicamente el 10% de los caballos en el mundo habita en zonas libres de piroplasmosis (de Waal, 1992).

En España hay pocos estudios que permitan conocer datos de prevalencias y los que hay no abarcan todas las zonas del territorio. No existen datos en el norte, noreste, este de la península, ni en las islas Baleares y Canarias.

El objetivo de este trabajo es obtener datos de prevalencia de *B. caballi* y *T. equi* del norte de España.

4. METODOLOGÍA

4.1. Revisión bibliográfica

Para la realización de este TFG se llevó a cabo una revisión bibliográfica basada principalmente en la búsqueda de artículos científicos en bases de datos.

En concreto, se han utilizado las siguientes bases de datos: ScienceDirect, NCBI, PubMed, Scopus, Medline, CAB International y SpringerLink, utilizando las palabras clave: “piroplasmosis equina”, “seroprevalencia”, “*Babesia caballi*” y “*Theileria equi*” principalmente.

Se ha intentado que la información sea lo más recientes posible para evitar con ello que ésta esté desactualizada; preferentemente se han seleccionado artículos a partir del año 2000 y de forma ideal, de los últimos 10 años.

Un aspecto que se ha tenido en cuenta es que los artículos utilizados hayan sido publicados en revistas indexadas en el Journal Citation Reports. Algunas de las revistas en las que se encuentran publicados los artículos utilizados son: The Journal of Veterinary Science, Veterinary Parasitology, Parasitology Research, Parasite Journal, Tick and Tick-borne disease, International Journal of Parasitology, entre otras.

También se han consultado libros pertenecientes a la Biblioteca de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

4.2. Estudio experimental

Para la realización de la parte experimental del TFG, se recogieron muestras de sangre de caballos. Las muestras se obtuvieron del matadero de Zaragoza el 7 de marzo de 2019. Los animales procedían de explotaciones cárnicas de zonas del Pirineo y de la Cornisa Cantábrica.

Para la obtención de la sangre se utilizaron tubos para extracción de sangre al vacío, en concreto, tubos sin anticoagulante: Vacutainer serum No additive.

Para la obtención del suero, se procedió a la centrifugación de las muestras de sangre. Se utilizó una centrifugadora Hettich Universal 32R, con el programa 3 y 1800 rpm durante 15min. El suero se recogió en tubos eppendorf, que fueron identificados y puestos en congelación a -18°C hasta su uso.

Estudio de prevalencia de *Babesia* y *Theileria* en la especie equina.

Como técnica diagnóstica se utilizó la inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección semicuantitativa de anticuerpos IgG específicos. Para su realización se adquirieron dos kits comerciales para la detección de *Babesia caballi* y de *Theileria equi* de forma independiente, MegaFLUO® *BABESIA caballi* y MegaFLUO® *THEILERIA equi* respectivamente, de laboratorios MEGACOR. El procedimiento a seguir fue el siguiente:

- Preparación PBS 10x: Se preparó una solución de 80 gr. NaCl, 2 gr. KCl, 2 gr. KH₂PO₄ y 11,5 gr. Na₂HPO₄ en 1L de agua destilada. Se ajustó a pH 7,2-7,4 y se almacenó a temperatura ambiente.
- Preparación del PBS 1x: Para ello se tomó 100mL de la solución 10x y 900mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 7,2-7,4 y se almacenó en refrigeración hasta su uso.
- Atemperar: Los componentes del kit (a excepción del conjugado) y los sueros a analizar deben estar a temperatura ambiente en el momento de aplicación.
- Preparación de las diluciones: Las diluciones se prepararon en placas ELISA de 96 pocillos. En las columnas (1,2,3...) se colocaron los sueros a analizar, mientras que en las filas (A,B,C...) se prepararon las diluciones (Figura 6).

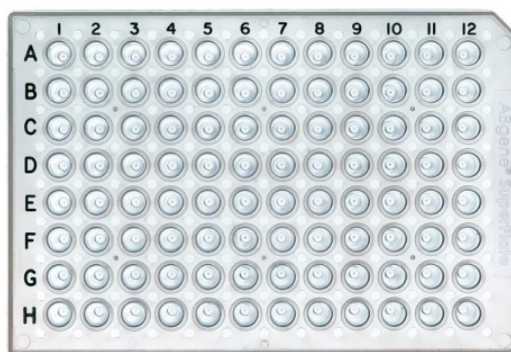


Figura 6. Placa ELISA utilizada para preparar las diluciones.

Se inició preparando la dilución 1:20. Para ello, se tomaron 190µl de PBS 1x con la pipeta multicanal y se colocaron en los primeros pocillos de las columnas (1, 2, 3...), después, utilizando una pipeta individual, se añadieron 10µl de cada suero a analizar (previamente agitado).

Estudio de prevalencia de *Babesia* y *Theileria* en la especie equina.

Para obtener el resto de diluciones, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320... se añadieron 100µl de PBS 1x en los pocillos restantes. A continuación, con la pipeta multicanal, se fueron pasando 100µl de cada pocillo al de la fila siguiente, empezando desde la dilución más concentrada hacia la menos concentrada y homogeneizando.

- Preparación de las placas: Se extrajeron las placas antigenadas de los envases correspondientes y se pusieron sobre una cámara húmeda. Se colocó una gota de control positivo y de control negativo en cada placa.

Como indica el propio kit, el punto de corte recomendado es la dilución 1:80, por lo que se empezó a trabajar con esa dilución. Para ello, se colocó en cada campo de antígeno restante 20µL de cada una de las muestras preparadas, tanto en la placa de *Babesia* como en la placa de *Theileria* (Figura 7).



Figura 7. Placas antigenadas de *B. caballi* y *T. equi*.

Las placas se identificaron adecuadamente incluyendo el género del parásito a analizar, la fecha y el número de muestra.

- Primera incubación: Se cerró la cámara húmeda y se introdujo en la estufa para su incubación a 37°C durante 30 minutos.
- Etapa de lavado: Se dio un golpe seco suavemente con la muñeca a las placas para eliminar el exceso de muestra, seguidamente, se lavaron en agitación los portaobjetos

Estudio de prevalencia de *Babesia* y *Theileria* en la especie equina.

durante 5 minutos en PBS 1x, repitiendo este paso otros 5 minutos renovando el PBS 1x (Figura 8). A continuación, se enjuagó brevemente el portaobjetos con agua destilada. Se eliminó suavemente el exceso de agua y se secó la humedad con un hisopo de algodón entre los campos de antígeno, con la precaución de que éstos no llegaran a secarse.



Figura 8. Lavado en agitación.

- Adición del conjugado: Se colocó en cada campo de antígeno, una gota FLUO FITC conjugado IgG anti-caballo, asegurándose de que los campos de antígeno se humedecieran por completo y se introdujo de nuevo en la cámara húmeda.
- Segunda incubación: Durante 30 minutos a una temperatura de 37°C y en oscuridad, con el fin de proteger al conjugado que es fotosensible.
- Etapa de lavado: Se repitió la etapa de lavado siguiendo los mismos pasos señalados antes pero en oscuridad, para proteger al conjugado.
- Montaje de la placa: Se aplicaron unas gotas de medio de montaje sobre la placa y se colocó cuidadosamente el cubreobjetos. Es aconsejable eliminar las burbujas de aire, suavemente.
- Evaluación: Se evaluaron los portaobjetos bajo un microscopio de fluorescencia a 400× magnificación mediante la comparación de los patrones de fluorescencia de las muestras con los del control positivo o negativo.

Estudio de prevalencia de *Babesia* y *Theileria* en la especie equina.

Imagen de **fluorescencia positiva** $\geq 1:80$ (Figura 9): Hay cuerpos de inclusión brillantes (merozoitos o trofozoitos), claramente reconocibles, regularmente teñidos e intensamente marcados en el citoplasma de los eritrocitos infectados o en el exterior si se trata de eritrocitos lisados. El citoplasma de las células infectadas muestra una ligera fluorescencia amarillo-verdosa.

Imagen de **fluorescencia negativa** $< 1:80$ (Figura 10): Las células no muestran fluorescencia amarilla-verdosa, aparecen de color rojo-grisáceo o ya no son reconocibles.

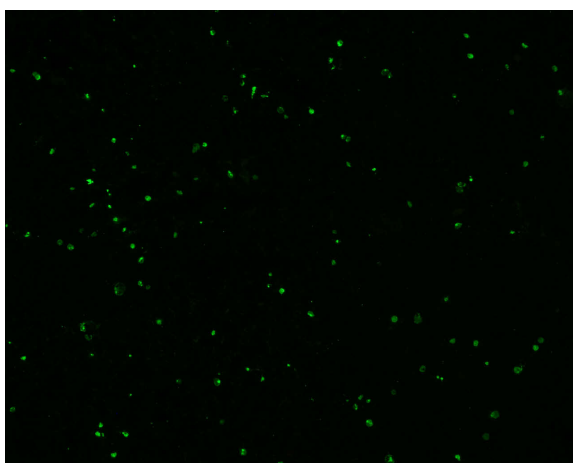


Figura 9. Imagen de fluorescencia positiva a *B. caballi* / *T. equi*.

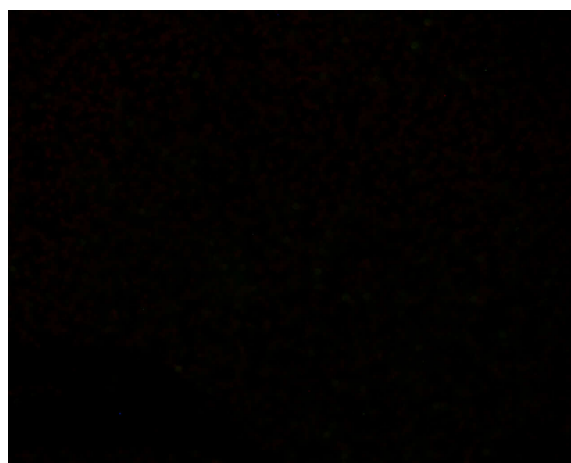


Figura 10. Imagen de fluorescencia negativa a *B. caballi* / *T. equi*.

- Almacenamiento: Una vez evaluadas, las placas se conservaron en refrigeración (entre 2 - 8°C) y en la oscuridad durante 7 días.

4.3. Análisis estadístico:

Todos los datos y resultados obtenidos se recogieron en una hoja de cálculo Microsoft Office Excel para su posterior análisis estadístico. Los cálculos estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics, vs24.

El análisis descriptivo de los datos se desarrolló mediante el cálculo de frecuencias. Para realizar el análisis estadístico de dos variables categóricas se aplicó la prueba no paramétrica de Chi-cuadrado de Pearson para tablas de contingencia. La comparación de una variable continua (título de anticuerpos) entre grupos (*Babesia* y *Theileria*) se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney ya que se compararon dos medianas. Los valores $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

5. RESULTADOS

En este estudio experimental, se analizaron 50 muestras de sangre de caballos. La información disponible acerca de estos animales es la reflejada en la Tabla 2. Del total de animales, un 36% son hembras y un 64% machos. La gran mayoría, el 86%, son de aptitud cárnica a excepción de cuatro caballos de silla, dos ponis y un mula. Cabe destacar también que cuatro de ellos son potros de menos de 1 año de edad.

Tabla 2. Información disponible de los animales analizados.

Nº	Edad	Aptitud	Sexo (*)	Nº	Edad	Aptitud	Sexo (*)
1	Potro	Cárnico	H	26	Adulto	Cárnico	M
2	Potro	Cárnico	M	27	Adulto	Cárnico	M
3	Potro	Cárnico	H	28	Adulto	Cárnico	M
4	Potro	Cárnico	M	29	Adulto	Cárnico	H
5	Adulto	Poni	H	30	Adulto	Cárnico	M
6	Adulto	Poni	M	31	Adulto	Cárnico	M
7	Adulto	Cárnico	M	32	Adulto	Cárnico	M
8	Adulto	Cárnico	M	33	Adulto	Cárnico	M
9	Adulto	Cárnico	M	34	Adulto	Cárnico	M
10	Adulto	Cárnico	M	35	Adulto	Cárnico	M
11	Adulto	Cárnico	H	36	Adulto	Cárnico	H
12	Adulto	Cárnico	H	37	Adulto	Cárnico	M
13	Adulto	Cárnico	M	38	Adulto	Silla	H
14	Adulto	Cárnico	H	39	Adulto	Silla	M
15	Adulto	Cárnico	H	40	Adulto	Cárnico	H
16	Adulto	Cárnico	M	41	Adulto	Silla	H
17	Adulto	Cárnico	M	42	Adulto	Silla	H
18	Adulto	Cárnico	M	43	Adulto	Mula	H
19	Adulto	Cárnico	M	44	Adulto	Cárnico	M
20	Adulto	Cárnico	M	45	Adulto	Cárnico	M
21	Adulto	Cárnico	M	46	Adulto	Cárnico	H
22	Adulto	Cárnico	M	47	Adulto	Cárnico	M
23	Adulto	Cárnico	M	48	Adulto	Cárnico	H
24	Adulto	Cárnico	M	49	Adulto	Cárnico	H
25	Adulto	Cárnico	M	50	Adulto	Cárnico	H

(*) M: Macho y H: Hembra.

Los resultados (positivos o negativos) y títulos obtenidos tras la realización de la IFI son los reflejados en la Tabla 3. Se realizó un cribado de las muestras con la titulación 1:80 y aquellas que resultaron positivas se fueron titulando hasta la dilución 1:640. La seroprevalencia total obtenida es de un 50% para *B. caballi*, de un 30% para *T. equi* y de un 16% para las infecciones mixtas.

Estudio de prevalencia de *Babesia* y *Theileria* en la especie equina.

Tabla 3. Resultados y títulos obtenidos de *Babesia caballi* y *Theileria equi* mediante inmunofluorescencia indirecta

Nº	<i>Babesia caballi</i>		<i>Theileria equi</i>		Nº	<i>Babesia caballi</i>		<i>Theileria equi</i>	
	Resultado	Título	Resultado	Título		Resultado	Título	Resultado	Título
1	-		-		26	-		+	1:640
2	-		+	1:80	27	-		-	
3	-		-		28	-		-	
4	-		-		29	+	1:80	+	1:80
5	+	1:80	+	1:80	30	-		-	
6	-		-		31	+	1:320	-	
7	+	1:160	-		32	+	1:320	+	1:80
8	-		-		33	-		-	
9	+	1:160	-		34	-		-	
10	-		-		35	-		-	
11	+	1:320	-		36	+	1:320	-	
12	+	1:320	-		37	+	1:160	-	
13	-		+	1:160	38	-		+	1:80
14	+	1:160	-		39	+	1:320	-	
15	+	1:160	-		40	-		-	
16	+	1:640	-		41	-		+	1:80
17	+	1:320	-		42	+	1:160	-	
18	+	1:320	+	1:80	43	-		-	
19	-		-		44	+	1:320	+	1:80
20	-		-		45	+	1:160	+	1:80
21	-		-		46	+	1:80	+	1:160
22	+	1:640	-		47	-		+	1:80
23	-		-		48	+	1:80	-	
24	+	1:320	-		49	-		+	1:160
25	+	1:160	+	1:80	50	+	1:320	-	

En la tabla 4 se presentan los datos de los animales parasitados (infectados por *B. caballi*, *T. equi* o ambas) en relación de la edad, el sexo y la aptitud.

Tabla 4. Tabla de contingencia de las frecuencias de animales parasitados y no parasitados para cada uno de los factores analizados (edad, sexo y aptitud)

Animales			Edad			Sexo (*)			Aptitud		
			Adulto	Potro	Total	H	M	Total	Cárnico	Otro	Total
			-	n	15	3	18	4	14	18	16
	%	32,6%	75,0%	36,0%	22,2%	43,8%	36,0%	37,2%	28,6%	36,0%	
	+	n	31	1	32	14	18	32	27	5	32

Estudio de prevalencia de *Babesia* y *Theileria* en la especie equina.

	%	67,4%	25,0%	64,0%	77,8%	56,3%	64,0%	62,8%	71,4%	64,0%
Total	n	46	4	50	18	32	50	43	7	50
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

(*) M: Macho y H: Hembra.

Utilizando la prueba no paramétrica de Chi cuadrado, se analizó si la proporción de animales parasitados (infectados por *B. caballi*, *T. equi* o ambas) estaba condicionada por el sexo, la edad o la aptitud. Como resultado se obtuvo que no existen diferencias estadísticamente significativas en función de la edad ($P_{\text{Chi}^2} = 0,09$), del sexo ($P_{\text{Chi}^2} = 0,128$), o de la aptitud ($P_{\text{Chi}^2} = 0,659$).

En la tabla 5 se presentan los datos de los animales parasitados por *B. caballi* o *T. equi* en relación a la edad, el sexo y la aptitud.

Tabla 5. Tabla de contingencia de las frecuencias de animales positivos y negativos a *B. caballi* y a *T. equi* de forma independiente para cada uno de los factores analizados.

			<i>Babesia caballi</i>		Total	<i>Theileria equi</i>		Total
			-	+		-	+	
Edad	Adulto	n	21	25	46	32	14	46
		%	45,7%	54,3%	100,0%	69,6%	30,4%	100,0%
		% del total	42,0%	50,0%	92,0%	64,0%	28,0%	92,0%
	Potro	n	4	0	4	3	1	4
		%	100,0%	0,0%	100,0%	75,0%	25,0%	100,0%
		% del total	8,0%	0,0%	8,0%	6,0%	2,0%	8,0%
Sexo	Hembra	n	7	11	18	12	6	18
		%	38,9%	61,1%	100,0%	66,7%	33,3%	100,0%
		% del total	14,0%	22,0%	36,0%	24,0%	12,0%	36,0%
	Macho	n	18	14	32	23	9	32
		%	56,3%	43,8%	100,0%	71,9%	28,1%	100,0%
		% del total	36,0%	28,0%	64,0%	46,0%	18,0%	64,0%
Aptitud	Cárnico	n	21	22	43	31	12	43
		%	48,8%	51,2%	100,0%	72,1%	27,9%	100,0%
		% del total	42,0%	44,0%	86,0%	62,0%	24,0%	86,0%
	Otro	n	4	3	7	4	3	7
		%	57,1%	42,9%	100,0%	57,1%	42,9%	100,0%
		% del total	8,0%	6,0%	14,0%	8,0%	6,0%	14,0%
Total	n	25	25	50	35	15	50	
	%	50,0%	50,0%	100,0%	70,0%	30,0%	100,0%	
	% del total	50,0%	50,0%	100,0%	70,0%	30,0%	100,0%	

Estudio de prevalencia de *Babesia* y *Theileria* en la especie equina.

Realizando la prueba no paramétrica de Chi cuadrado, se analizó en este caso si la proporción de positivos y negativos a *B. caballi* y a *T. equi* de forma independiente, estaba condicionada por la edad, el sexo o la aptitud.

En el caso de *B. caballi* no existe relación entre las proporciones de animales positivos y negativos en relación al sexo ($P_{Chi2}= 0,239$), ni a la aptitud ($P_{Chi2}= 0,684$). En cambio, sí que existen diferencias estadísticamente significativas en relación a la edad ($P_{Chi2}= 0,037$), por lo que la proporción de animales infectados con *B. caballi* es estadísticamente superior en adultos que en potros.

Con respecto *T. equi* no se observaron diferencias entre las proporciones de positivos y negativos en función de la edad ($P_{Chi2}= 0,82$), del sexo ($P_{Chi2}= 0,7$), ni de la aptitud ($P_{Chi2}= 0,423$).

De forma complementaria, se realizó la prueba de Mann-Whitney en la que se compararon una variable continua (título de anticuerpos en su representación logarítmica), con una variable categórica (*B. caballi* y *T. equi*). La variable continua incluyó también a los animales negativos, es decir, a toda la población. Como resultado de la prueba se obtuvo que la mediana en *B. caballi* (0,9565, rango = 0,01-2,81) es significativamente mayor que la mediana en *T. equi* (0,01, rango = 0,01-2,81), $P_{M-W} = 0,004$ (Figura 11), es decir, los títulos serológicos obtenidos en *B. caballi* son estadísticamente más elevados que los obtenidos con *T. equi*.

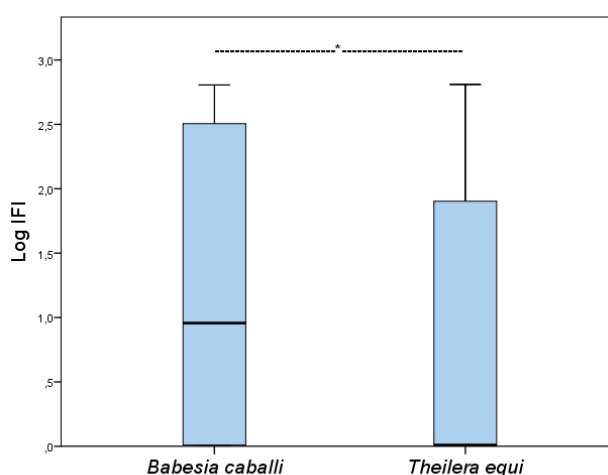


Figura 11. Títulos de anticuerpos (en logaritmos) en función del parásito (*Babesia/Theileria*). La grafica muestra la mediana (línea dentro de la caja), percentil 25 y 75 (caja), máximo y mínimo (barras). El asterisco muestra el valor de P , siendo $P < 0,01$.

6. DISCUSIÓN

La prevalencia de *B. caballi* obtenida en este TFG proporciona los valores más elevados en relación a los estudios que se han publicado hasta la fecha (García-Bocanegra *et al.*, 2013; Montes Cortés *et al.*, 2017; Camino *et al.*, 2018). Nuestros datos se asemejarían a los obtenidos en Brasil y en China (Heim *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014). Además, los títulos de anticuerpos están significativamente aumentados en los animales infectados por *B. caballi*, lo que podría deberse a una infección reciente, aguda o a un primer contacto con el parásito (Rothschild, 2013).

Los datos de prevalencia de *T. equi* obtenidos son ligeramente inferiores a los publicados por el resto de estudios. Nuestros datos se asemejan a las prevalencias de Madrid y de Castilla León, y son inferiores a los de Castilla la Mancha, Extremadura, Andalucía y Galicia (Camacho *et al.*, 2005; García Bocanegra *et al.*, 2013; Montes Cortés *et al.*, 2017). Fuera de España los datos obtenidos son similares a las prevalencias en Italia (Sgorbini *et al.*, 2015) y Egipto (Mahmoud *et al.*, 2016).

Los datos de infecciones mixtas obtenidos son en general superiores a los obtenidos en otros estudios realizados en España (Montes Cortés *et al.*, 2017; Camino *et al.*, 2018).

Globalmente, si analizamos nuestros resultados en conjunto (prevalencia de *B. caballi*, de *T. equi* y de las infecciones mixtas), observamos que estos son similares a los obtenidos por Montes Cortés *et al.*, (2017) en un estudio realizado en la comunidad autónoma de Castilla León. Esta similitud resulta lógica ya que coincide con la zona más próxima a la zona de procedencia de los animales utilizados en el presente estudio. En el resto de estudios realizados en España, la diferencia entre los datos de prevalencia que aportan y los obtenidos en este estudio son mayores, va disminuyendo la prevalencia de *B. caballi* y aumentando la de *T. equi* conforme se baja hacia el centro y sur de la península (Camacho *et al.*, 2005; García-Bocanegra *et al.*, 2013; Montes Cortés *et al.*, 2017; Camino *et al.*, 2018).

La prevalencia de *B. caballi* es superior a la de *T. equi*, coincidiendo con algunos estudios como el realizado en Venezuela en 2013 (Rosales *et al.*, 2013) , o en China en 2014 (Wang *et al.*, 2014). Sin embargo, en la mayoría de estudios realizados en países endémicos ocurre de forma contraria, *T. equi* es más prevalente que *B. caballi* (Kouam *et al.*, 2010; García-Bocanegra *et al.*, 2013; Mahmoud *et al.*, 2016). A pesar de ser menos prevalente, *B. caballi* se

ha identificado en más regiones (sobre todo de zonas del norte) del hemisferio norte (Friedhoff *et al.*, 1990).

Existen una serie de factores que podrían justificar los resultados que se han obtenido en el presente estudio. Un factor importante que ha podido influir en los resultados es la edad. El análisis estadístico que se ha realizado indica una mayor positividad a *B. caballi* en los animales adultos. Aunque cabe destacar que el grupo de animales jóvenes lo forman solamente cuatro potros y que la información disponible acerca de la edad de los animales únicamente hacía diferencia entre potros lechales de menos de un año, y de más de un año, por lo que se asumió este segundo grupo como adultos, aunque se desconocía su edad real. También es importante señalar que las muestras recogidas fueron en su mayoría procedentes de animales de producción cárnica, que normalmente no alcanzan edades avanzadas.

Si se relaciona la edad con la infección por *T. equi*, normalmente en los caballos mayores de 9 años el porcentaje de animales infectados por esta especie supera el 50% (Karatepe *et al.*, 2009; Kouam *et al.*, 2010; Montes Cortés *et al.*, 2017). Esto puede deberse en gran medida a que un animal infectado por *T. equi* permanece seropositivo de por vida, mientras que uno infectado por *B. caballi* lo hace durante un periodo máximo de 4 años (de Waal, 1992). El hecho de que se considere que nuestro grupo de animales adultos no tengan edades muy avanzadas podría justificar la menor prevalencia de *T. equi* obtenida en relación a otros estudios (Camacho *et al.*, 2005; Montes Cortés *et al.*, 2017). Es posible que en el caso del único potro que aparece positivo (que además lo es a *T. equi*), dicha seropositividad se deba a la inmunidad calostrual (Donnelly *et al.*, 1982).

Otro factor es la técnica diagnóstica utilizada, según Montes Cortés en su estudio comparativo entre IFI y ELISA, la utilización de la técnica IFI pudo conllevar una sobreestimación de la prevalencia de *B. caballi* (Montes Cortés *et al.*, 2017). Por otro lado, la técnica ELISA es especialmente sensible para *T. equi*, por lo que puede dar resultados superiores de este agente (Knowles *et al.*, 1992).

Otro factor importante que puede haber influido en los resultados es el vector, ya que la prevalencia superior de *B. caballi* estaría relacionada con la presencia del vector específico para su transmisión (Mujica *et al.*, 2011). Las garrapatas del género *Dermacentor* actúan como vectores para *B. caballi*, en concreto la especie *D. marginatus*, y esta especie está presente en

zonas frías del norte de la península. Tiene actividad invernal y es abundante en zonas de vegetación escasa (Rubel *et al.*, 2016).

En relación a la aptitud, en un estudio realizado en 2013 por García-Bocanegra *et al.*, se indica que el riesgo de ser seropositivo para *B. caballi* aumentaba de 3 a 5 veces si los animales se encontraban en condiciones de campo, relacionados con actividades agrícolas y manteniéndose en peores condiciones de manejo y alojamiento. Demostraba como la prevalencia de *B. caballi* era mayor en rebaños sin refugio, comparándola con la prevalencia de animales alojados en establos con cuadras, pudiéndose asemejar este tipo de manejo de campo al de una explotación cárnica. En nuestro estudio no se ha podido confirmar ninguna relación entre la aptitud cárnica y una mayor prevalencia de *B. caballi*.

Es importante destacar que los resultados obtenidos deben tomarse con precaución debido a que el tamaño de muestra no es muy elevado.

En definitiva, la combinación de factores como la edad, la aptitud, la técnica diagnóstica utilizada y la presencia del vector, podrían justificar los resultados obtenidos.

7. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

- La seroprevalencia obtenida tanto para *B. caballi* como para *T. equi* es elevada, y es además similar a la seroprevalencia que aportan estudios en zonas limítrofes.
- Es especialmente destacable la alta seroprevalencia de *B. caballi* y el elevado título de anticuerpos que presentan los animales infectados por esta especie.
- La prevalencia de *B. caballi* es superior a la de *T. equi*, a diferencia de la mayoría de los estudios realizados en zonas endémicas.
- La edad es un factor que ha podido condicionar el resultado de seroprevalencia obtenido para ambos parásitos.
- No se ha demostrado que el sexo o la aptitud hayan influido en la prevalencia obtenida en el presente estudio.

CONCLUSIONS

- The seroprevalence obtained for both *B. caballi* and *T. equi* is high, and is also similar to the seroprevalence provided by studies in bordering areas.

Estudio de prevalencia de *Babesia* y *Theileria* en la especie equina.

- Especially noteworthy is the high seroprevalence of *B. caballi* and the high antibody titre of animals infected by this species.
- The prevalence of *B. caballi* is higher than that of *T. equi*, unlike most studies conducted in endemic areas.
- Age is a factor that may have conditioned the seroprevalence result obtained for both parasites.
- It has not been demonstrated that sex or aptitude have influenced the prevalence obtained in the present study.

8. VALORACIÓN PERSONAL Y AGRADECIMIENTOS

Con la realización de este trabajo he aprendido a buscar y contrastar información, a citar artículos bibliográficos y a estructurar un estudio científico, además de adquirir unas nociones básicas de estadística. Además he descubierto gratamente el trabajo en el laboratorio y no lo descarto como opción para un futuro.

En primer lugar me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han acompañado en la realización de este trabajo, en primer lugar a mi tutora M^a Jesús Gracia y a las compañeras de la Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias Paz Peris y Paula Ortega, por ayudarme en todo momento. También quiero agradecer a Antonio Romero por facilitarme las muestras para el análisis y a Juan Antonio Castillo por sus consejos.

Así como a todos mis amigos y familiares que no solo han estado apoyándome ahora, sino durante los últimos 5 años de carrera, a los que pongo fin con este trabajo.

9. BIBLIOGRAFIA

- Allsopp, M. T. E. P., Lewis, B. D. and Penzhorn, B. L. (2007) "Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals", *Veterinary Parasitology*, 148(2), pp. 130–136. doi:10.1016/j.vetpar.2007.05.017.
- Ambawat, H. K., Malhotra, D. V., Kumar, S. and Dhar, S. (1999) "Erythrocyte associated haemato-biochemical changes in *Babesia equi* infection experimentally produced in donkeys", *Veterinary Parasitology*, 85(4), pp. 319–324. doi:10.1016/s0304-4017(99)00110-7.

Estudio de prevalencia de *Babesia* y *Theileria* en la especie equina.

- Anderson, J. F. and Magnarelli, L. A. (2008) "Biology of Ticks", *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2), pp. 195–215. doi:10.1016/j.idc.2007.12.006.
- Bartolomé del Pino, L. E. (2017) *Situación epidemiológica y clínica de la piroplasmosis equina en áreas endémicas*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Bartolomé Del Pino, L. E., Roberto, N., Veneziano, V., Francesca, I., Antonella, C., Luca, A. G., Francesco, B. and Teresa, S. M. (2016) "*Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Central-Southern Italy: Sero-molecular survey and associated risk factors", *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7(3), pp. 462–469. doi:10.1016/j.ttbdis.2016.01.011.
- Böse, R., Jorgensen, W. K., Dalgliesh, R. J., Friedhoff, K. T. and de Vos, A. J. (1995) "Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis", *Veterinary Parasitology*, 57(1–3), pp. 61–74. doi:10.1016/0304-4017(94)03111-9.
- Brown, W. C. (2001) "Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis*, a protozoan parasite that causes persistent infection", *Veterinary Parasitology*, 101(3–4), pp. 233–248. doi:10.1016/s0304-4017(01)00569-6.
- Brüning, A. (1996) "Equine piroplasmosis an update on diagnosis, treatment and prevention.", *British Veterinary Journal*, 152(2), pp. 139–151. doi:10.1016/S0007-1935(96)80070-4.
- Butler, C. M., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M., Stout, T. A., van der Kolk, J. H., van den Wollenberg, L., Nielen, M., Jongejan, F., Werners, A. H. and Houwers, D. J. (2012) "Prevalence of the causative agents of equine piroplasmosis in the South West of The Netherlands and the identification of two autochthonous clinical *Theileria equi* infections", *Veterinary Journal*, 193(2), pp. 381–385. doi:10.1016/j.tvjl.2011.12.014.
- Camacho, A. T., Guitian, F. J., Pallas, E., Gestal, J. J., Olmeda, A. S., Habela, M. A., Telford, S. R. and Spielman, A. (2005) "*Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain", *Tropical Animal Health and Production*, 37(4), pp. 293–302. doi:10.1007/s11250-005-5691-z.
- Camino, E., de la Cruz, M. L., Dominguez, L., Carvajal, K. A., Fores, P., de Juan, L. and Cruz-Lopez, F. (2018) "Epidemiological Situation of the Exposure to Agents Causing Equine Piroplasmosis in Spanish Purebred Horses in Spain: Seroprevalence and Associated Risk Factors", *Journal of Equine Veterinary Science*, 67, pp. 81–86. doi:10.1016/j.jevs.2018.03.012.
- Cantú-Martínez, M. A., Segura-Correa, J. C., Silva-Páez, M. L., Avalos-Ramírez, R. and Wagner, G. G. (2012) "Prevalence of Antibodies to *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Horses From Northeastern Mexico", *Journal of Parasitology*, 98(4), pp. 869–870. doi:10.1645/GE-3064.1.
- Center for Food Security & Public Health (2008) "Piroplasmosis equina". Ames: CFSPH. Available at:

http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/equine_piroplasmosis-es.pdf. [Accessed 6-9-2019]

- Criado-Fornelio, A., Martínez-Marcos, A., Buling-Saraña, A. and Barba-Carretero, J. C. (2003) "Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe: Part I. Epizootiological aspects", *Veterinary Parasitology*, 113(3–4), pp. 189–201. doi:10.1016/s0304-4017(03)00078-5.
- Donnelly, J., Phipps, L. P. and Watkins, K. L. (1982) "Evidence of maternal antibodies to *Babesia equi* and *B. caballi* in foals of seropositive mares", *Equine Veterinary Journal*, 14(2), pp. 126–128. doi:10.1111/j.2042-3306.1982.tb02365.x.
- Erbsloh, J. (1975) "Babesiosis in the newborn foal", *Journal of reproduction and fertility*, Supplement(23), pp. 725–726. Available at: <http://europepmc.org/abstract/med/1060872>. [Accessed 28-10-2019]
- Estrada-Peña, A. (2015) "CLASE ARACHNIDA Orden Ixodida: Las garrapatas", *Revista IDE@-SEA*, 13, pp. 1–15. Available at: www.sea-entomologia.org/IDE@. [Accessed 6-11-2019]
- Friedhoff, K. T. and Soulé, C. (1996) "An account on equine babesioses", *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 15(3), pp. 1191–1201. doi:10.20506/rst.15.3.972.
- Friedhoff, K. T., Tenter, A. M. and Müller, I. (1990) "Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses.", *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 9(4), pp. 1187–1194. doi:10.20506/rst.9.4.535.
- Fritz, D. (2010) "A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008)", *Parasitology Research*, 106(6), pp. 1339–1342. doi:10.1007/s00436-010-1804-3.
- García-Bocanegra, I., Arenas-Montes, A., Hernández, E., Adaszek, Ł., Carbonero, A., Almería, S., Jaén-Téllez, J. A., Gutiérrez-Palomino, P. and Arenas, A. (2013) "Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids", *Veterinary Journal*, 195(2), pp. 172–178. doi:10.1016/j.tvjl.2012.06.012.
- Georges, K. C., Ezeokoli, C. D., Sparagano, O., Pargass, I., Campbell, M., D'Abadie, R. and Yabsley, M. J. (2011) "A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad", *Veterinary Parasitology*, 175(3–4), pp. 363–366. doi:10.1016/j.vetpar.2010.10.019.
- Guimarães, A. M., Lima, J. D. and Ribeiro, M. F. B. (1998) "Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*", *Parasitology Research*, 84(4), pp. 323–327. doi:10.1007/s004360050404.
- Güven, E., Avcioglu, H., Deniz, A., Balkaya, I., Abay, U., Yavuz, S. and Akyüz, M. (2017) "Prevalence and molecular characterization of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in jereed horses in Erzurum,

- Turkey", *Acta Parasitologica*, 62(1), pp. 207–213. doi:10.1515/ap-2017-0025.
- Heim, A., Passos, L. M. F., Ribeiro, M. F. B., Costa, L. M., Bastos, C. V., Cabral, D. D., Hirzmann, J. and Pfister, K. (2007) "Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil", *Parasitology Research*, 102(1), pp. 63–68. doi:10.1007/s00436-007-0726-1A.
- Huang, X., Xuan, X., Yokoyama, N., Xu, L., Suzuki, H., Sugimoto, C., Nagasawa, H., Fujisaki, K. and Igarashi, I. (2003) "High-level expression and purification of a truncated merozoite antigen-2 of *Babesia equi* in *Escherichia coli* and its potential for immunodiagnosis", *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3), pp. 1147–1151. doi:10.1128/jcm.41.3.1147-1151.2003.
- Ikadai, H., Sasaki, M., Ishida, H., Matsuu, A., Igarashi, I., Fujisaki, K. and Oyamada, T. (2007) "Molecular evidence of *Babesia equi* transmission in *Haemaphysalis longicornis*", *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(4), pp. 694–697. doi:10.4269/ajtmh.2007.76.694.
- Iori, A., Gabrielli, S., Calderini, P., Moretti, A., Pietrobelli, M., Tampieri, M. P., Galuppi, R. and Cancrini, G. (2010) "Tick reservoirs for piroplasms in central and northern Italy", *Veterinary Parasitology*, 170(3–4), pp. 291–296. doi:10.1016/j.vetpar.2010.02.027.
- Karatepe, B., Karatepe, M., Çakmak, A., Karaer, Z. and Ergün, G. (2009) "Investigation of seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Nigde province, Turkey", *Tropical Animal Health and Production*, 41(1), pp. 109–113. doi:10.1007/s11250-008-9164-z.
- Kerber, C. E. (1999) "Control of equine piroplasmiasis in Brazil", *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 66(2), pp. 123–127. Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=ZA1999000559> [Accessed 6-10-2019]
- Knowles, D. (1996) "Equine babesiosis (piroplasmiasis): a problem in the international movement of horses.", *The British veterinary journal*, 152(2), pp. 123–126. Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301516358>. [Accessed 12-10-2019]
- Knowles, D. P., Kappmeyer, L. S. and Perryman, L. E. (1994) "Specific immune responses are required to control parasitemia in *Babesia equi* infection", *Infection and Immunity*, 62(5), pp. 1909–1913. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC186438/>. [Accessed 28-10-2019]
- Knowles, D. P., Kappmeyer, L. S., Stiller, D., Hennager, S. G. and Perryman, L. E. (1992) "Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi*", *Journal of Clinical Microbiology*, 30(12), pp. 3122–3126. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC270599/>. [Accessed 28-10-2019]

- Kouam, M. K., Kantzoura, V., Gajadhar, A. A., Theis, J. H., Papadopoulos, E. and Theodoropoulos Georgios, G. (2010) "Seroprevalence of equine piroplasms and host-related factors associated with infection in Greece", *Veterinary Parasitology*, 169(3–4), pp. 273–278. doi:10.1016/j.vetpar.2010.01.011.
- Kurt, C. and Yaman, M. (2012) "The investigation of the prevalence of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horses by microscopic and serologic (cELISA) methods in Adana province", *Yüzüncü yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23(1), pp. 1–4. Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123179089>. [Accessed 13-10-2019]
- Lapage, G. (1981) *Parasitología Veterinaria*. (6th ed.) México: Continental.
- Mahmoud, M. S., Abu El-Ezz, N. T., Abdel-Shafy, S., Nassar, S. A., El Namaky, A. H., Khalil, W. K. B., Knowles, D., Kappmeyer, L., Silva, M. G. and Suarez, C. E. (2016) "Assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in equine populations in Egypt by molecular, serological and hematological approaches", *Parasites and Vectors*, 9(1), pp. 1–10. doi:10.1186/s13071-016-1539-9.
- Márquez-Jiménez, F. J., Hidalgo-Pontiveros, A., Contreras-Chova, F., Rodríguez-Liébana, J. J. and Muniain-Ezcurra, M. Á. (2005) "Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España", *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(2), pp. 94–102. doi:10.1157/13071613.
- Mason, C. A. and Norval, R. A. I. (1981) "The transfer of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) from infested to uninfested cattle under field conditions", *Veterinary Parasitology*, 8(2), pp. 185–188. doi:10.1016/0304-4017(81)90046-7.
- Maurer, F. D. (1962) "Equine Piroplasmiasis - another emerging disease", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 14, pp. 699-702. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14471543>. [Accessed 10-11-2019]
- Mehlhorn, H. and Schein, E. (1993) "The piroplasms: "A long story in short" or "Robert Koch has seen it"", *European Journal of Protistology*, 29(3), pp. 279–293. doi:10.1016/S0932-4739(11)80371-8.
- Mehlhorn, H. and Schein, E. (1998) "Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998", *Parasitology Research*, 84(6), pp. 467–475. doi:10.1007/s004360050431w.
- Moltmann, U. G., Mehlhorn, H., Schein, E., Voigt, W. P. and Friedhoff, K. T. (1983) "Ultrastructural Study on the Development of *Babesia equi* (Coccidia: Piroplasmia) in the Salivary Glands of its Vector Ticks", *The Journal of Protozoology*, 30(2), pp. 218–225. doi:10.1111/j.1550-

7408.1983.tb02907.x.

- Montes Cortés, M. G., Fernández-García, J. L. and Habela Martínez-Estélez, M. (2019) "A multinested PCR for detection of the equine piroplasmids *Babesia caballi* and *Theileria equi*", *Ticks and Tick-borne Diseases*, 10(2), pp. 305–313. doi:10.1016/j.ttbdis.2018.11.008.
- Montes Cortés, M. G., Fernández-García, J. L. and Martínez-Estélez, M. Á. H. (2017) "Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Spain", *Parasite*, 24, pp. 1–11. doi:10.1051/parasite/2017015.
- Mosqueda, J., Ramos, J. A., Falcon, A., Alvarez, J. A., Aragon, V. and Figueroa, J. V. (2004) "*Babesia bigemina*: Sporozoite isolation from *Boophilus microplus* nymphs and initial immunomolecular characterization", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026(1), pp. 222–231. doi:10.1196/annals.1307.034.
- Mujica, F. F., Perrone, T., Forlano, M., Coronado, A., Meléndez, R. D., Barrios, N., Álvarez, R. and Granda, F. (2011) "Serological prevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses of Lara State, Venezuela", *Veterinary Parasitology*, 178(1–2), pp. 180–183. doi:10.1016/j.vetpar.2010.12.036.
- Phipps, L. P. (2010) "Equine piroplasmiasis", *Equine Veterinary Education*, 8(2), pp. 25–28. doi:10.1111/j.2042-3292.1996.tb01850.x.
- Polanco, D. and Rios, L. (2016) "Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras", *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(1), pp. 81–95. doi:10.21930/rcta.vol17_num1_art:463.
- Real Federación Hípica Española (2013) "Estudio del impacto del sector ecuestre en España". Ames: RFHE. Available at: <http://www.rfhe.com/informacion-rfhe/estudio-global-de-impacto-econo/estudio-del-impacto-del-sector-ecuestre-en-espana/>. [Accessed: 7-10-2019]
- Ribeiro, A. J., Cardoso, L., Maia, J. M., Coutinho, T. and Cotovio, M. (2013) "Prevalence of *Theileria equi*, *Babesia caballi*, and *Anaplasma phagocytophilum* in horses from the north of Portugal", *Parasitology Research*, 112(7), pp. 2611–2617. doi:10.1007/s00436-013-3429-9.
- Rosales, R., Rangel-Rivas, A., Escalona, A., Jordan, L. S., Gonzatti, M. I., Aso, P. M., Perrone, T., Silva-Iturriza, A. and Mijares, A. (2013) "Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Venezuelan horses using Competitive-Inhibition ELISA and PCR", *Veterinary Parasitology*, 196(1–2), pp. 37–43. doi:10.1016/j.vetpar.2013.02.004.
- Rothschild, C. M. (2013) "Equine piroplasmiasis", *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(7), pp. 497–508. doi:10.1016/j.jevs.2013.03.189.
- Rubel, F., Brugger, K., Pfeffer, M., Chitimia-Dobler, L., Didyk, Y. M., Leverenz, S., Dautel, H. and Kahl, O. (2016) "Geographical distribution of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* in

- Europe", *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7(1), pp. 224–233. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.10.015.
- Sant, C., D'Abadie, R., Pargass, I., Basu, A. K., Asgarali, Z., Charles, R. A. and Georges, K. C. (2016) "Prospective study investigating transplacental transmission of equine piroplasmiasis in thoroughbred foals in Trinidad", *Veterinary Parasitology*, 226, pp. 132–137. doi:10.1016/j.vetpar.2016.07.008.
- Sgorbini, M., Bonelli, F., Nardoni, S., Rocchigiani, G., Corazza, M. and Mancianti, F. (2015) "Seroprevalence and Molecular Analysis of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Horses From Central Italy During a 10-Year Period", *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(10), pp. 865–868. doi:10.1016/j.jevs.2015.08.011.
- Shaw, M. K. (2003) "Cell invasion by *Theileria* sporozoites", *Trends in Parasitology*, 19(1), pp. 2–6. doi:10.1016/s1471-4922(02)00015-6.
- Sigg, L., Gerber, V., Gottstein, B., Doherr, M. G. and Frey, C. F. (2010) "Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in the Swiss horse population", *Parasitology International*, 59(3), pp. 313–317. doi:10.1016/j.parint.2010.02.005.
- Stilller, D., Goff, W. L., Johnson, L. W. and Knowles, D. P. (2002) "*Dermacentor variabilis* and *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): Experimental Vectors of *Babesia equi* to Equids : Table 1", *Journal of Medical Entomology*, 39(4), pp. 667–670. doi:10.1603/0022-2585-39.4.667.
- Sumbria, D., Singla, L. Das and Sharma, A. (2016) "*Theileria equi* and *Babesia caballi* infection of equids in Punjab, India: a serological and molecular survey", *Tropical Animal Health and Production*, 48(1), pp. 45–52. doi:10.1007/s11250-015-0917-1.
- Taylor, M. A., Coop, R. L. and Wall, R. L. (2013) *Veterinary Parasitology*. (3rd ed.) Oxford: Wiley-Blackwell.
- Ueti, M. W. and Knowles, D. P. (2018) "Equine piroplasmiasis", in Florin-Christensen, M. and Schnittger, L. (eds.) *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets*. Hurlingham: Springer International Publishing, pp. 259–269.
- Ueti, M. W., Palmer, G. H., Scoles, G. A., Kappmeyer, L. S. and Knowles, D. P. (2008) "Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the apicomplexan parasite *Babesia equi*", *Infection and Immunity*, 76(8), pp. 3525–3529. doi:10.1128/IAI.00251-08.
- Vieira, T. S. W. J., Vieira, R. F. C., Finger, M. A. P., Nascimento, D. A. G., Sicupira, P. M. L., Dutra, L. H., Deconto, I., Barros-Filho, I. R., Dornbusch, P. T., Biondo, A. W. and Vidotto, O. (2013) "Seroepidemiological survey of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from a rural and from urban areas of Paraná State, southern Brazil", *Ticks and Tick-borne Diseases*, 4(6), pp.

537–541. doi:10.1016/j.ttbdis.2013.07.005.

de Waal, D. T. (1992) "Equine piroplasmiasis: A review", *British Veterinary Journal*, 148(1), pp. 6–14. doi:10.1016/0007-1935(92)90061-5.

Wang, M., Guo, W., Igarashi, I., Xuan, X., Wang, X., Xiang, W. and Jia, H. (2014) "Epidemiological investigation of equine piroplasmiasis in China by enzyme-linked immunosorbent assays", *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(4), pp. 549–552. doi:10.1292/jvms.13-0477.

Wise, L. N., Kappmeyer, L. S., Mealey, R. H. and Knowles, D. P. (2013) "Review of Equine Piroplasmiasis", *Journal of Chemical Information and Modeling*, 27(6), pp. 1334–1346. doi:10.1111/jvim.12168.

World Organisation for Animal Health (2018) "Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres". Available at: <https://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/acceso-en-linea/>. [Accessed: 6-10-2019]

Zobba, R., Ardu, M., Niccolini, S., Chessa, B., Manna, L., Cocco, R. and Pinna Parpaglia, M. L. (2008) "Clinical and Laboratory Findings in Equine Piroplasmiasis", *Journal of Equine Veterinary Science*, 28(5), pp. 301–308. doi:10.1016/j.jevs.2008.03.005.