

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**Estrategias para la prevención y el control de Theileria equi y
Babesiacaballi en la población de équidos de España**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Eliazar Camino Gutiérrez

Directores

Lucas Domínguez
Fátima Cruz

Madrid



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal

CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA (VISAVET)

Servicio de Vigilancia Sanitaria Equina (SEVISEQ)

TESIS DOCTORAL

Estrategias para la prevención y el control de *Theileria equi* y *Babesia caballi* en la población de équidos de España

Memoria para optar al grado de Doctor con menciones de Doctorado
Internacional presentada por

Eliazar Camino Gutiérrez

DIRECTORES

Lucas Domínguez y Fátima Cruz

Madrid, 2021

Contratos y becas de investigación:

El trabajo de tesis doctoral que se presenta a continuación se ha realizado en el marco de los siguientes contratos y becas de investigación:

- Ayudas para contratos predoctorales UCM de personal investigador en formación. Programa de Financiación de Universidad Complutense de Madrid - Banco Santander. Convocatoria 2016 (CT27/16 - CT28/16).
- Ayudas para estancias breves en España y en el extranjero de los beneficiarios del programa de formación de personal investigador de la UCM. Convocatoria 2019 (EB14/19).

A mis padres y a mi hermano,
las personas más importantes de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Todavía estoy asimilando todo lo que el año 2020 y principios del 2021 nos han dejado para el recuerdo. Vivencias que contaremos a nuestros hijos y nietos. Nunca me hubiera imaginado que la escritura de esta tesis se iniciaría durante el confinamiento decretado en España debido a la pandemia mundial provocada por un nuevo coronavirus (COVID-19) y el fin de la misma durante la conocida como borrasca "Filomena", la cual dejaría un temporal de nieve y frío en todo el país. Siempre he sido partidaria de los años impares, y aunque este año no ha empezado del todo bien estoy segura que terminará mucho mejor.

Antes de comenzar con los agradecimientos me gustaría hacer un repaso de mis cuatro años en VISAVET. Al echar la vista atrás se dibuja una sonrisa en mi cara. Un sinfín de buenos recuerdos me vienen a la cabeza. He conocido a gente maravillosa que siempre ha estado dispuesta a ayudarme cuando lo necesitaba. VISAVET no solo brilla por la ciencia creada en sus laboratorios, sino también por el compañerismo y la empatía de todos los que trabajan ahí.

En primer lugar, me gustaría nombrar a las personas que creyeron en mí desde el primer minuto y que dieron su confianza para que se pudiese llevar a cabo esta tesis doctoral: Fátima y Lucas, como directores de esta tesis, y Lucía, como directora el centro VISAVET. Fátima, te mereces una mención especial en estos agradecimientos. No puedo estar más agradecida de haber trabajado mano a mano contigo. Pese a todas las dificultades que hemos sufrido dentro del grupo SEVISEQ siempre hemos caminado juntas hacia adelante, hacia el mismo objetivo. Me has enseñado a ver la luz en medio de la oscuridad y a luchar por lo que uno quiere. En mi corta vida laboral no he conocido a una persona tan trabajadora, luchadora y con tal entusiasmo por mejorar día a día. Como te dije hace unos meses, no te considero una jefa sino una líder ya que has sido mi guía durante estos cuatro años, te has preocupado por mí y me has aconsejado como si de tu segunda hija (como sueles decir☺) me tratase.

Gracias a todos mis compañeros integrantes del grupo SEVISEQ. Kelly, Abel, Arantxa, Paloma, esta tesis también ha sido posible gracias a vosotros. Mil gracias por vuestra ayuda. Pese a que hemos pasado por épocas de mucho estrés, siempre hemos salido victoriosos gracias al buen equipo que formábamos. Ha sido una suerte trabajar con vosotros.

Gracias Pili y Álvaro, mejores compis de despacho ("despacho de la sabiduría") y mejores amigos. Supervivientes de tesis. Tesis trillizas separadas al nacer. Gracias por escuchar mis agobios y mis cabreos y por las muchas risas e historias que han vivido esas cuatro paredes. Os merecéis todo lo mejor. Gracias Marisa, Alex (mi 2º padre), Víctor (chico del cable de SEVISEQ), Mazas, Casas, Clara, Marga, Almudena y Susana. Estoy muy contenta de haberos conocido. Gracias a todos los miembros de los grupos NED, ICM, MYC, ZTA y SAP por echarme un cable y dejarme usar vuestros equipos siempre que lo he necesitado. Gracias al grupo SIC (Javi, Sergio y Carlos) por ayudarme con las figuras de los artículos y con la maquetación de la tesis.

Thanks Anne (my Scottish mother) and Wallace (my Scottish pet) for doing my stay in Glasgow unforgettable. Thanks Robert and Brian, colleagues at University of Glasgow, for your help with nested PCR and for your friendly hosting into the parasitology team from the first day. I'm very grateful to have felt at home during those three months. Gracias a Marta, Andreu, Juan y Jorge, españoles en Glasgow. Gracias por las excursiones, los cafés y las salidas nocturnas de fin de semana.

A David, mi compañero de vida. Gracias por haberme apoyado durante esta aventura llamada tesis y por hacerme sentir que puedo con esto y con más. Espero que sigamos construyendo juntos nuestro futuro, que a día de hoy y con tanto esfuerzo ha empezado a dar sus frutos.

Y, por último, y no menos importante, gracias a mis padres Carmen y Domingo y a mi hermano Marcos, las personas más importantes de mi vida. Aunque la familia no se puede elegir, yo os elegiría una y mil veces más. Gracias por vuestros consejos, por creer siempre en mí, por soportar mis enfados y por empujarme a ser mejor persona cada día.

PRESENTACIÓN DE LA TESIS

Esta tesis es un compendio de cinco artículos de investigación originales, derivados de la realización de un estudio piloto, un estudio nacional y tres estudios complementarios, en los cuales la doctoranda figura como primer autor. Dichos artículos se corresponden con el plan de investigación presentado inicialmente en el programa de Doctorado, han sido publicados durante el tiempo de permanencia de la alumna en dicho programa y proceden directamente del trabajo de la misma.

La idoneidad de publicar esta tesis en formato de publicaciones se sustenta en que estos cinco artículos presentan una cohesión temática, consiguiendo una extensa investigación del tema propuesto de estudio. La publicación de estos trabajos refleja que la doctoranda ha adquirido habilidades para el diseño, el desarrollo y el análisis de una encuesta epidemiológica, y para la realización e interpretación de las distintas pruebas laboratoriales utilizadas en el diagnóstico de la enfermedad de estudio. Además, para lograr la publicación de dichos artículos, la doctoranda ha aprendido a manejar distintos programas estadísticos e interpretar los datos derivados de los mismos, y ha colaborado con especialistas clínicos equinos y con investigadores externos de Reino Unido con el objetivo de recolectar las muestras necesarias para la ejecución de los estudios y de realizar estudios genéticos en dichas muestras, respectivamente.

A continuación, se presenta un listado con las referencias completas de los artículos incluidos en esta tesis doctoral:

1. Estudio piloto: *Epidemiological situation of the exposure to agents causing equine piroplasmosis in Spanish Purebred horses in Spain: seroprevalence and associated risk factors.*

Autores: Eliazar Camino, María Luisa de la Cruz, Lucas Domínguez, Kelly Alejandra Carvajal, Paloma Forés, Lucía de Juan, Fátima Cruz López.

Revista: *Journal of Equine Veterinary Science*.

Año: 2018

Volumen: 67

Páginas: 81-86

DOI: 10.1016/j.jevs.2018.03.012

2. Estudio nacional: Sero-molecular survey and risk factors of equine piroplasmosis in horses in Spain.

Autores: Eliazar Camino, Aránzazu Buendía, Abel Dorrego, Pilar Pozo, Lucía de Juan, Lucas Domínguez, Fátima Cruz López.

Revista: *Equine Veterinary Journal*.

Año: 2020

Volumen: en prensa

Páginas: en prensa

DOI: 10.1111/evj.13348

3. Estudio complementario 1: Serological, molecular and hematological diagnosis in horses with clinical suspicion of equine piroplasmosis: pooling strengths.

Autores: Eliazar Camino, Abel Dorrego, Kelly Alejandra Carvajal, Aránzazu Buendía, Lucía de Juan, Lucas Domínguez, Fátima Cruz López.

Revista: *Veterinary Parasitology*.

Año: 2019

Volumen: 275

Páginas: 108928

DOI: 10.1016/j.vetpar.2019.108928

4. Estudio complementario 2: *Importance of equine piroplasmosis antibody presence in Spanish horses prior to export.*

Autores: Eliazar Camino, Pilar Pozo, Abel Dorrego, Kelly Alejandra Carvajal, Aránzazu Buendía, Sergio González, Lucía de Juan, Lucas Domínguez, Fátima Cruz López.

Revista: *Ticks and Tick-borne Diseases.*

Año: 2020

Volumen: 11

Páginas: 101329

DOI: 10.1016/j.ttbdis.2019.101329

5. Estudio complementario 3: *Phylogenetic analysis and geographical distribution of Theileria equi and Babesia caballi sequences from horses residing in Spain.*

Autores: Eliazar Camino, Fátima Cruz López, Lucía de Juan, Lucas Domínguez, Brian Shiels, Robert M Coultous.

Revista: *Ticks and Tick-borne Diseases.*

Año: 2020

Volumen: 11

Páginas: 101521

DOI: 10.1016/j.ttbdis.2020.101521

RESUMEN

La piroplasmosis equina (PE) es una enfermedad parasitaria de los équidos (caballos, burros, mulas y cebras) causada por dos protozoos apicomplexos intraeritrocitarios: *Theileria equi* (antes designado como *Babesia equi*) y *Babesia caballi*. Estos parásitos son principalmente transmitidos por garrapatas ixódidas pertenecientes a los géneros *Dermacentor*, *Hyalomma* y *Rhipicephalus*; sin embargo, la transmisión puede también ocurrir por transfusión materno-fetal y por vía iatrogénica. Esta enfermedad puede manifestarse de forma hiperaguda, aguda, subaguda o crónica, por medio de signos clínicos variables y no específicos tales como: fiebre ($>40^{\circ}\text{C}$), palidez de las mucosas, ictericia, edema periférico, anorexia, pérdida de peso, disminución del rendimiento y esplenomegalia. Los caballos que superan la infección aguda pueden permanecer como portadores de estos parásitos durante largos periodos de tiempo, siendo una fuente de infección para las garrapatas y otros caballos.

La PE se considera endémica en muchos países del sur de Europa (incluyendo España), África, Asia, Centro y Suramérica. Países como EEUU, Canadá, Japón, Nueva Zelanda y Australia están libres de esta enfermedad, estatus que intentan mantener permitiendo solo la entrada de caballos seronegativos a PE. Este requisito limita el movimiento internacional de caballos provocando así elevadas pérdidas económicas en el sector equino español ya que una gran parte de los caballos resultan seropositivos. Este hecho afecta especialmente al comercio de caballos de Pura Raza Española (P.R.E), los cuales suponen el 85% de los caballos de raza pura en España y casi el 100% de las exportaciones a Europa y América.

Hasta la fecha, la PE solo ha sido estudiada en determinadas regiones geográficas de nuestro país y con frecuencia el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad están basados únicamente en el criterio clínico y epidemiológico de los veterinarios de campo, sin tener una confirmación por el laboratorio de la presencia en sangre de los agentes parásitos. Es por esto que los objetivos principales de la presente tesis doctoral incluyeron la

descripción de la actual situación epidemiológica y diversidad genética de *T. equi* y *B. caballi* existente en todo el territorio español, la estimación de las pérdidas económicas que la PE supone para la industria equina española y la evaluación de las técnicas diagnósticas más apropiadas en caballos con sospecha clínica de esta enfermedad. Para ello se llevaron a cabo cinco estudios: un estudio piloto en la zona centro de España, un estudio nacional y tres estudios complementarios.

El estudio piloto se llevó a cabo realizando muestreos en explotaciones ubicadas en la zona centro de España y dedicadas a la cría de caballos P.R.E. Este estudio reveló la presencia de al menos un caballo seropositivo en el 81.1% (68.2%-94.0%) de las explotaciones estudiadas junto con la existencia de una moderada exposición [24.9% (21.3%-28.6%)] de estos caballos a *T. equi* y/o *B. caballi*, demostrando así el elevado riesgo de infección de PE al que están expuestos los caballos que residen en dicha zona.

En el estudio nacional se recogieron muestras de caballos aparentemente sanos realizándose un muestreo aleatorio estratificado por CCAA en función del censo de caballos existente en cada una de estas regiones. La elevada seroprevalencia de PE encontrada [42.9% (39.4-46.5)] y el alto porcentaje de caballos que demostraron ser portadores asintomáticos [30.3% (27.0-33.6)] confirmaron la situación endémica de esta enfermedad en nuestro país, existiendo una exposición dos veces mayor a *T. equi* [35.8% (32.3-39.25)] que a *B. caballi* [15.6% (13.0-18.2)]. Navarra y Extremadura fueron las CCAA con mayores niveles de positividad a PE, mientras que los niveles más bajos se encontraron en Castilla La Mancha, Andalucía y en el área este del país.

En los dos estudios anteriores también se llevaron a cabo encuestas epidemiológicas, que incluían información relativa tanto del propio animal como de la explotación de residencia del mismo, con el objetivo de identificar factores de riesgo asociados con mayores niveles de seroprevalencia de PE. Un mayor número de sementales en las explotaciones, el aumento de la edad de los caballos, la presencia de garrapatas y el contacto directo con ganado bovino fueron factores

relacionados con una mayor seropositividad a PE. Por el contrario, la aplicación de un programa de vacunación y de medidas de desinfección en las explotaciones, junto con la asistencia de los caballos a ferias, competiciones u otras actividades resultaron ser factores que podrían ayudar a controlar dicha enfermedad.

En el estudio complementario 1 se incluyeron muestras de sangre de caballos que mostraban signos clínicos compatibles con PE, llevándose a cabo en dichas muestras análisis hematológicos, bioquímicos, inmunológicos y moleculares. Los caballos parasitados por *B. caballi* mostraron una anemia hemolítica más severa que aquellos parasitados por *T. equi*, encontrándose en éstos últimos una marcada leucocitosis. El nivel de acuerdo entre los resultados de PE de los tests serológicos y moleculares fue moderado ($k = 0.587$); sin embargo, pese a que un elevado número de caballos (42.9%) resultaron positivos a PE mediante PCR, la visualización de los agentes parásitos utilizando frotis sanguíneos solo se demostró en un 9.3% de los individuos. Estos resultados confirman que la PCR es la técnica de elección para el diagnóstico correcto de la PE en cuanto a la detección de *T. equi* y/o *B. caballi*, pudiendo además considerar ciertos parámetros hematológicos como biomarcadores de la infección causada por uno u otro parásito.

El estudio complementario 2 se desarrolló con el fin de conocer el impacto económico que la PE supone en la exportación de caballos a países libres de esta enfermedad. El análisis serológico de PE realizado en caballos con destino exportación durante un periodo de tres años (2015-2016, 2016-2017, 2017-2018) reveló que un 24.1% (22.6-25.5) de estos caballos no podían ser comercializados a dichos países, suponiendo así pérdidas anuales de aproximadamente 14.5 millones de euros. Además, se observó un aumento significativo del 2.2% en el número de individuos positivos a *B. caballi* a lo largo de dicho periodo (2015-2018).

Por último, en el estudio complementario 3 se investigó la presencia y distribución geográfica de los distintos genotipos de *T. equi* y *B. caballi* que circulan actualmente por todo el territorio nacional. Los análisis filogenéticos revelaron la existencia de tres genotipos para *T. equi* (A, D y E) y dos para *B.*

caballi (A y B), identificándose por primera vez en nuestro país los genotipos D y B. El genotipo A de *B. caballi* se encontró únicamente en regiones del norte de España. Sin embargo, se demostró la existencia de una mayor circulación de *T. equi*, localizándose al genotipo E en todas las CCAA estudiadas y al genotipo A en zonas del centro y del sur de la península.

Los resultados de esta tesis doctoral indican la existencia de una elevada exposición a *T. equi* y *B. caballi* en todo el territorio nacional junto con una posible propagación de estos parásitos en la actualidad, hecho asociado principalmente al movimiento no controlado de caballos tanto entre las distintas CCAA españolas como entre países endémicos de PE. La implantación en España de una vigilancia epidemiológica anual y de pruebas serológicas previas a dichos movimientos podrían ayudar a controlar esta enfermedad.

SUMMARY

Equine piroplasmosis (EP) is a parasitic disease of equids (horses, donkeys, mules and zebras) caused by two intraerythrocytic protozoan parasites within the phylum Apicomplexa: *Theileria equi* (previously named *Babesia equi*) and *Babesia caballi*. These parasites are mainly transmitted by ixodid tick species belonging to several genera such as *Dermacentor*, *Hyalomma* and *Rhipicephalus*; however, transmission may also occur vertically in utero and iatrogenically. This disease has a hyperacute, acute, subacute or chronic form; affected animals often show variable and nonspecific clinical signs such as: fever (often exceeding 40°C), pale mucous membranes, jaundice, peripheral edema, anorexia, weight loss, decreased performance and splenomegaly. Horses can remain carriers of these parasites for a long time after the resolution of acute disease, being a source of infection for ticks and other horses.

EP is endemic in many southern European countries (including Spain), Africa, Asia, Central and South America. Countries such as United States, Canada, Japan, New Zealand and Australia are "EP-free", a status maintained by restrictions on importation of EP seropositive horses. This requirement limits the international movement of horses, causing severe economic losses to the Spanish equine sector, since a large number of horses test seropositive for EP. This fact especially affects the trade of Spanish Purebred (SP) horses, which account around 85% of purebred horses in Spain and almost 100% of exports to Europe and America.

To date, EP has only been studied in certain geographic regions of our country and veterinary surgeons often base the diagnosis and treatment of this disease on clinical and epidemiological criteria, without having a confirmation by the laboratory of the presence of these parasites in the bloodstream. The main objectives of this doctoral thesis included the determination of the current epidemiological situation and genetic diversity of *T. equi* and *B. caballi* nationwide, the estimation of the economic losses that EP involves for the Spanish equine industry and the evaluation of the

most appropriate diagnostic tests in horses with clinical suspicion of this disease. Five studies were performed: a pilot study in central Spain, a nationwide study and three complementary studies.

The pilot study was carried out by sampling at SP breeding stud farms located in central region of Spain. This study revealed the presence of at least one seropositive horse in 81.1% (68.2% -94.0%) of the stud farms together with the existence of a moderate exposure [24.9% (21.3% -28.6%)] of these horses to *T. equi* and/or *B. caballi*, demonstrating central Spain can be considered as high-risk area for EP infection.

In the national study, samples of apparently healthy horses were collected using a random stratified sampling based on the horse census in each Spanish autonomous community. The high seroprevalence of EP [42.9% (39.4-46.5)] and the considerable percentage of asymptomatic carriers horses found [30.3% (27.0-33.6)] confirmed the endemic situation of this disease in our country, being the exposure to *T. equi* [35.8% (32.3- 39.25)] two-fold higher than *B. caballi* [15.6% (13.0-18.2)]. Navarre and Extremadura were the autonomous communities with the highest levels of positivity to EP, while the lowest levels were found in Castile La Mancha, Andalusia and in the eastern area of Spain.

Within the two previous studies, a questionnaire was designed to cover the main characteristics of each sampled horse and its farm with the aim to identifying risk factors associated with higher levels of EP seroprevalence. The number of stallions residing in the stud farms, the increase in horse age, the presence of ticks and the contact with cattle were factors related to a higher seropositivity to EP. By contrast, the implementation of vaccination programs and disinfection measures in the stud farms, together with fairs/competitions attendance were factors associated with the control of this disease.

The complementary study 1 included blood samples from horses showing clinical signs of EP. Hematological, biochemical, immunological and molecular analysis were carried out on these samples. Horses parasitized by *B. caballi* showed a more severe hemolytic anemia, whereas *T. equi* infections were mostly associated with leukocytosis. The level of agreement between EP results of serological and molecular tests was moderate ($k =$

0.587); however, blood smears examination revealed the presence of hemoprotozoan agents compatible with *T. equi* and/or *B. caballi* in only 9.3% of horses, even when 42.9% of horses tested EP positive by PCR. These results confirm PCR is the test of choice in order to confirm the presence of these parasites in clinical cases of EP. In addition, certain hematological parameters can be considered as biomarkers of the infection caused by one or another parasite.

The complementary study 2 was developed in order to have a greater knowledge of the economic losses that EP involves for the exportation of horses from Spain to EP-free countries. Serum samples from horses collected prior to export for a period of three years (2015-2016, 2016-2017 and 2017-2018) were tested by serological analysis. Serological results revealed that 24.1% (22.6-25.5) of horses could not be exported to these countries, meaning that 14.5 million euro would be lost each year in Spain. Moreover, there was a significant increase of 2.2% for the number of horses seropositive to *B. caballi* during this period (2015-2018).

Finally, the complementary study 3 investigated the presence and geographical distribution of *T. equi* and *B. caballi* genotypes circulating currently within the country. Phylogenetic analysis revealed that the *T. equi* isolates grouped into three genotypes (A, D and E), while *B. caballi* isolates were placed into two genotypes (A and B). Isolates from *T. equi* genotype D and *B. caballi* genotype B had not previously been reported in Spain. Genotype A of *B. caballi* was only found in northern regions. However, *T. equi* showed a widespread distribution, locating genotype E in all sampled communities and genotype A in central and southern areas of Spain.

The results of this doctoral thesis indicate the existence of a high exposure to *T. equi* and *B. caballi* nationwide together with a possible spread of these parasites at present, a finding mainly associated with the uncontrolled movement of horses both between the different Spanish autonomous communities and between Spain and other EP-endemic countries. The implementation of an annual epidemiological surveillance programme and mandatory serological screening of horses prior to movements could aid to control this disease in our country.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	30
1.1	El sector equino en España	31
1.1.1	Cría	33
1.1.2	Exportación	35
1.2	La piroplasmosis equina	37
1.2.1	Etiología	37
1.2.1.1	Ciclo biológico de <i>Babesia caballi</i>	39
1.2.1.2	Ciclo biológico de <i>Theileria equi</i>	40
1.2.2	Transmisión	41
1.2.3	Epidemiología	46
1.2.4	Patogénesis e Inmunidad	51
1.2.5	Manifestaciones clínicas	53
1.2.5.1	Signos clínicos	53
1.2.5.2	Alteraciones hematológicas	56
1.2.5.3	Alteraciones bioquímicas	56
1.2.5.4	Hallazgos patológicos	57
1.2.6	Diagnóstico	57
1.2.6.1	Diferencial	57
1.2.6.2	Directo	58
1.2.6.2.1	Microscópico	58
1.2.6.2.2	Molecular	59
1.2.6.2.3	<i>In vitro</i>	60
1.2.6.3	Indirecto	62
1.2.6.3.1	Serología mediante fijación del complemento (FC)	62
1.2.6.3.2	Serología mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI)	63
1.2.6.3.3	Serología mediante ELISA de competición (cELISA)	63
1.2.6.3.4	Otras técnicas serológicas	64
1.2.7	Tratamiento	65

1.2.8	Control y prevención.....	67
1.2.9	Factores de riesgo asociados	68
1.2.9.1	Intrínsecos	70
1.2.9.2	Extrínsecos	72
1.2.10	Filogénesis	74
1.2.10.1	<i>Theileria equi</i>	75
1.2.10.2	<i>Babesia caballi</i>	76
1.2.11	Estudios de piroplasmosis equina en España	77
1.2.12	Impacto económico mundial y en España	81
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	83
2.1	Hipótesis	84
2.2	Objetivos	87
3.	PLAN DE TRABAJO / METODOLOGÍA	90
3.1	Área/población de estudio y tamaño de la muestra	91
3.2	Análisis serológicos	93
3.2.1	ELISA de competición (cELISA)	93
3.2.2	Fijación del complemento (FC)	96
3.3	Frotis sanguíneos	99
3.4	Análisis hematológicos.....	100
3.5	Análisis bioquímicos	101
3.6	Análisis moleculares	103
3.6.1	PCR a tiempo real de tipo <i>multiplex</i>	103
3.6.2	PCR anidada	104
3.7	Análisis filogenéticos	106
3.8	Análisis estadísticos	107
4.	RESULTADOS	110
4.1	Estudio piloto.....	111
4.1.1	Artículo 1: Situación epidemiológica de la exposición a los agentes causantes de la piroplasmosis equina en caballos de Pura Raza Española en España: seroprevalencia y factores de riesgo asociados.....	111
4.2	Estudio nacional.....	120
4.2.1	Artículo 2: Estudio sero-molecular y factores de riesgo asociados a la piroplasmosis equina en caballos residentes en España	120
4.3	Estudios complementarios	136

4.3.1	Artículo 3: Diagnóstico serológico, molecular y hematológico en caballos con sospecha clínica de piroplasmosis equina: aunando fuerzas	136
4.3.2	Artículo 4: Importancia de la presencia de anticuerpos frente a la piroplasmosis equina en caballos con destino exportación residentes en España	144
4.3.3	Artículo 5: Análisis filogenético y distribución geográfica de secuencias de <i>Theileria equi</i> y <i>Babesia caballi</i> procedentes de caballos residentes en España	150
5.	DISCUSIÓN	159
5.1	Seroprevalencia de la PE	160
5.2	Prevalencia de la PE en caballos portadores asintomáticos	163
5.3	Factores de riesgo asociados con la seroprevalencia de la PE	164
5.4	Cambios hematológicos y bioquímicos en caballos clínicamente afectados por <i>T. equi</i> y/o <i>B. caballi</i>	166
5.5	Comparación de las distintas técnicas de diagnóstico de la PE	168
5.6	Diversidad genética de <i>T. equi</i> y <i>B. caballi</i> existente en España	170
5.7	Asociación de los genotipos con factores individuales y externos de los caballos	172
6.	CONCLUSIONES	174
7.	CONCLUSIONS	178
8.	BIBLIOGRAFÍA	182
9.	ANEXOS	196
9.1	Lista de acrónimos y abreviaturas	197
9.2	Lista de tablas	201
9.3	Lista de figuras	202
9.4	Estancias internacionales	203
9.5	Comunicaciones orales en congresos	203
9.6	Artículos de divulgación	204
9.7	Colaboración en tareas docentes	205
9.8	Organización de eventos científicos	205

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El sector equino en España

El sector equino en España ha sufrido cambios a lo largo del tiempo como consecuencia de su estrecha relación con la historia de nuestro país. Tradicionalmente, los caballos participaban en las guerras y eran utilizados como herramienta de trabajo en los campos de cultivo. En la actualidad, debido a un cambio en la economía y la sociedad española, los caballos han pasado a estar estabulados en fincas, explotaciones agrícolas o clubes y a estar dedicados a usos sociales o de recreación. Hoy en día, los caballos también tienen un papel importante en las corridas de toros, en las fuerzas y cuerpos de seguridad del Estado y en la celebración de fiestas patronales, ferias y romerías de numerosos pueblos y ciudades de España.

Dentro de la industria ecuestre están implicadas una gran cantidad de personas, cuya participación se incluye en alguno de los siguientes colectivos: laboral (mozos de cuadra, herradores, transportistas, veterinarios), deportivo (jinetes, amazonas, encargados de los hipódromos), investigación y desarrollo (trabajadores de compañías farmacéuticas y de organismos gubernamentales) y recreación (profesores de equitación, de terapias con caballos, trabajadores de explotaciones dedicadas al pupilaje o a las excursiones).

El sector equino español engloba una serie de actividades que se han clasificado atendiendo a la etapa de vida del caballo en la que tienen lugar: cría (reproducción natural y artificial, industria del semen y recría de caballos), transformación (entrenamiento y preparación del caballo) y explotación (competición, ocio e industria cárnica). De acuerdo a un estudio sobre el impacto del sector ecuestre en España publicado en el año 2013 (Deloitte, 2013), la etapa de explotación incluye a la mayoría de los caballos censados, siendo las actividades ligadas a los clubes y a las fincas privadas las que suponen un mayor aporte económico. Este estudio también destaca la importancia de las actividades transversales

(veterinarios, herradores, transportistas, etc) considerándose las exportaciones de caballos a terceros países una de las actividades con un gran impacto económico en la industria equina.

Según los datos recogidos por el Sistema Nacional de Información de Razas (ARCA), perteneciente al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) el número de explotaciones equinas ha aumentado un 49.9% en los últimos 10 años. Asimismo, el censo de équidos, aunque ha sufrido fluctuaciones a lo largo de estos años, ha aumentado un 21.9%. A fecha de 1 de julio de 2020 se contabilizaron unos 632.396 caballos y 191.238 explotaciones equinas en España. Andalucía es la Comunidad Autónoma en la que el sector ecuestre tiene una mayor importancia, representando el 33.0% del censo total con 208.702 caballos y el 38.4% (73.398) de las fincas registradas en España (MAPA, 2020b). En la tabla 1 se recogen tanto el censo de caballos como de explotaciones equinas por CCAA.

Tabla 1. Censo de caballos y de explotaciones equinas por CCAA.

CCAA	Nº de caballos (%)	Nº de explotaciones equinas (%)
Andalucía	208.702 (33.0)	73.398 (38.4)
Aragón	12.463 (2.0)	3.268 (1.7)
Asturias	37.621 (5.9)	10.653 (5.6)
Islas Baleares	15.677 (2.5)	4.425 (2.3)
Islas Canarias	4.828 (0.8)	1.342 (0.7)
Cantabria	25.089 (4.0)	5.910 (3.1)
Castilla La Mancha	23.932 (3.8)	6.954 (3.6)
Castilla y León	66.738 (10.5)	18.699 (9.8)
Cataluña	36.219 (5.7)	6.346 (3.3)
Extremadura	40.292 (6.4)	17.914 (9.4)
Galicia	40.751 (6.4)	19.045 (9.9)
Madrid	21.304 (3.4)	2.548 (1.3)
Murcia	8.811 (1.4)	2.924 (1.5)
Navarra	29.921 (4.7)	3.127 (1.6)
País Vasco	32.341 (5.1)	7.936 (4.1)
La Rioja	4.874 (0.8)	955 (0.5)
Valencia	22.833 (3.6)	5.794 (3.0)
Ceuta	-	-
Melilla	-	-
Total	632.396	191.238

Fuente: Datos del Sistema Integral de Trazabilidad Animal (SITRAN) a 1 de julio de 2020.

1.1.1 Cría

Con la publicación del RD 2129/2008 y su posterior actualización por el RD 45/2019, se establecieron las normas básicas y de coordinación del Programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas. Este Programa tiene diversos objetivos, entre los que destacan la caracterización y clasificación de las razas y variedades de las mismas para su inclusión en el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España, el reconocimiento de asociaciones de criadores de animales de razas ganaderas, la aprobación de programas de cría y la creación y registro de centros de reproducción y bancos de germoplasma. Varias especies de équidos fueron incluidas dentro de dicho Catálogo y clasificadas en razas autóctonas (de fomento y en peligro de extinción), integradas y otras razas reconocidas. El caballo Pura Raza Español (P.R.E) es una raza autóctona de fomento con una gran importancia para la industria equina española, aprobándose una nueva reglamentación del libro genealógico y del programa de mejora de dicha raza por medio de la resolución de la Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios del 22 de marzo de 2017.

Aunque el origen de la raza P.R.E es desconocido, se cree que pudo ser originada a partir del cruce de caballos ibéricos (Andaluz y Cartujano), localizados principalmente en el sur de la península, con caballos bereberes del norte de África (Valera et al., 2005). La conservación y mejora genética de la raza P.R.E fueron iniciadas a mediados del siglo XIX gracias a las escuelas veterinarias de Zaragoza, León y Córdoba. En 1912, se creó el primer libro genealógico en España con el fin de registrar los caballos pura sangre, árabes y angloárabes. Posteriormente, en 1972, se fundó en Sevilla la Asociación Nacional de Criadores de Caballos de Pura Raza Españoles (ANCCE) como base para la cría y la mejora genética del caballo P.R.E en España. Actualmente, la Federación de Asociaciones de Ganaderos de Caballo Español (FENACE) también colabora en dicha labor (ANCCE, 2020).

La gran mayoría de los caballos P.R.E se crían en un sistema semiintensivo en explotaciones para la cría y selección de razas puras, ya sean públicas o privadas, siendo estas últimas las más comunes. Dentro de las explotaciones privadas, la cría puede llevarse a cabo utilizando varias yeguas de cría y un semental o en centros de reproducción mediante la inseminación artificial. Estos centros suelen tener sementales (propios o de otros criadores), yeguas utilizadas para la extracción del semen (yeguas "teaser") y bancos de semen equino. La utilización de un sistema semiintensivo garantiza una mayor producción ya que los caballos están sujetos a un control más exhaustivo. Dado que el periodo de gestación de una yegua es de 11 meses y que el objetivo principal de estas explotaciones es obtener un potro por yegua y por año, es esencial que una yegua se quede preñada en los primeros días después del parto, para lo cual es necesario un buen manejo reproductivo. Otras explotaciones también utilizan la transferencia de embriones, técnica que permite que las yeguas con un alto valor genético continúen su carrera en el deporte (ANCCE, 2020).

De acuerdo a los datos censales publicados por el sistema ARCA, el caballo P.R.E es la raza más extendida en España. Esta raza se distribuye por todas las CCAA y, asimismo, está presente en 62 países de todo el mundo. Al inicio del año 2020, de los 643.547 caballos censados en España, 193.949 eran caballos P.R.E, siendo Andalucía la CCAA con un mayor número de caballos de esta raza (41.3%). Dentro de Andalucía, el mayor porcentaje del censo de P.R.E (25.4%) se localiza en la provincia de Sevilla. En la tabla 2 se recogen el número de caballos y de ganaderías activas P.R.E registradas por CCAA. Comparando estos datos con los recogidos en años anteriores, se ha observado una tendencia de expansión tanto del número de caballos P.R.E como del número de ganaderías dedicadas a la cría de esta raza.

Tabla 2. Número de caballos y de ganaderías activas P.R.E registradas por CCAA.

CCAA	Nº de caballos P.R.E (%)	Nº de explotaciones P.R.E (%)
Andalucía	80.160 (41.3)	12.627 (44.4)
Aragón	2.302 (1.2)	361 (1.3)
Asturias	2.052 (1.0)	550 (1.9)
Islas Baleares	4.225 (2.2)	776 (2.7)
Islas Canarias	707 (0.4)	357 (1.2)
Cantabria	1.589 (0.8)	311 (1.1)
Castilla La Mancha	13.855 (7.1)	1.659 (5.8)
Castilla y León	16.019 (8.2)	1.988 (7.0)
Cataluña	19.519 (10.1)	1.669 (5.9)
Extremadura	14.550 (7.5)	1.741 (6.1)
Galicia	5.307 (2.7)	1.082 (3.8)
Madrid	8.403 (4.3)	1.453 (5.1)
Murcia	8.549 (4.4)	1.350 (4.7)
Navarra	1.545 (0.8)	176 (0.6)
País Vasco	972 (0.5)	164 (0.6)
La Rioja	495 (0.2)	102 (0.3)
Valencia	13.699 (7.1)	2.086 (7.3)
Ceuta	1 (<0.1)	1 (<0.1)
Melilla	-	-
Total	193.949	28.453

Fuente: Datos del sistema ARCA a fecha 1 de enero de 2020.

1.1.2 Exportación

Desde hace años el comercio exterior de caballos ha ido adquiriendo importancia tanto en la exportación como en la importación de todos los productos incluidos en el sector equino: animales vivos con distintas finalidades (competición, recreación, matadero...), carne y despojos comestibles de caballo (cuyo destino habitual son países como Italia y Francia, con tradición de consumo de este tipo de carne). Los datos relativos a la evolución de dicho comercio, recogidos por la Subdirección General de Productos Ganaderos desde el año 2011 al 2018, mostraron que el volumen de las importaciones de estos productos es menor comparado con el de las exportaciones (395 vs. 8.016

toneladas), habiendo aumentado las exportaciones a terceros países un 633% en dicho periodo.

En relación al movimiento de animales vivos a lo largo de estos siete años (2011-2018), el número de caballos importados es mayor que el de exportados (60.513 vs. 5.463 caballos). Los países de la UE representan el principal origen (Holanda 48.6%, Francia 22.5%, Bélgica 19.9%) y destino (Italia 56.9% y Francia 40.4%) de estos caballos. En el año 2018 tuvo lugar un aumento del 28.6% de las exportaciones y una disminución del 69.1% de las importaciones con respecto a los datos recogidos en el 2017. En el año 2019 y de acuerdo con los datos publicados por el Comercio Exterior Ganadero (CEXGAN), la exportación anual de caballos se incrementó en un 65% con respecto al 2018. Sin embargo, hasta el mes de junio del año 2020 el número de caballos exportados ha disminuido un 39% con respecto al año 2019, manteniéndose EEUU y México como los principales destinos extracomunitarios para los mismos. Este descenso puede estar relacionado con la pandemia mundial derivada de la enfermedad por coronavirus iniciada en diciembre de 2019 (COVID-19) en la ciudad de Wuhan (China) y que actualmente está extendida por todo el mundo, suponiendo un problema de salud pública global y provocando un impacto socioeconómico disruptivo.

En el estudio realizado por Deloitte (2013) se indicó que el caballo P.R.E es el más exportado desde nuestro país, con una cifra de 1.452 caballos P.R.E exportados en el año 2012.

1.2 La piroplasmosis equina

La piroplasmosis equina (PE), enfermedad parasitaria transmitida por garrapatas, es una de las enfermedades infecciosas de mayor importancia para la industria equina mundial que afecta tanto a animales domésticos como salvajes pertenecientes a la familia *Equidae* (caballos, burros, mulas y cebras) (Wise, 2014). Esta enfermedad ha sido denominada previamente como malaria equina, fiebre biliar del equino, fiebre asociada a garrapatas en el caballo, babesiosis equina (Bowhill, 1905; Erbsloh, 1975; Knowles et al., 1966; Roberts et al., 1962) y theileriosis equina (Mehlhorn and Schein, 1998).

1.2.1 Etiología

Los protozoos parásitos intraeritrocitarios *Theileria equi* (*T. equi*) y *Babesia caballi* (*B. caballi*), pertenecientes al Filo Apicomplexa y al Orden Piroplasmida, son los agentes causantes de la PE, pudiendo ambos parásitos infectar a un mismo animal al mismo tiempo (De Waal, 1992). Estos protozoos son comúnmente conocidos como piroplasmas debido a que adoptan una forma piriforme en el interior de los glóbulos rojos del hospedador (Uilenberg, 2006). Aunque *T. equi* y *B. caballi* pueden causar la PE tanto de forma separada como conjunta, dichos parásitos son diferentes atendiendo a la gravedad de la enfermedad que desencadenan, dinámica de infección, ciclo biológico, persistencia en el animal y susceptibilidad a los fármacos (Wise et al., 2013). Los animales infectados pueden permanecer como portadores asintomáticos de estos parásitos durante largos periodos de tiempo actuando como fuentes de infección para las garrapatas, las cuales a su vez pueden parasitar a otros équidos. Es por esto que los individuos portadores representan un desafío en cuanto a su diagnóstico, erradicación y medidas de control (Wise et al., 2014).

La taxonomía de *T. equi* y *B. caballi* ha sido puesta en duda desde que en 1901 fue descrito un parásito intraeritrocitario en sangre periférica de caballos residentes en Suráfrica, al que se denominó *Piroplasma equi* (Laveran, 1901). Años más tarde, se describió que dos parásitos morfológicamente distintos podían infectar los glóbulos rojos de los equinos, denominándose al de mayor tamaño *Piroplasma caballi* y al de menor tamaño *Nuttallia equi* (Nuttall, 1910). En 1980 se revisó la clasificación general de los protozoos, reclasificando ambos parásitos dentro del género *Babesia* como *Babesia caballi* y *Babesia equi* (Levine et al., 1980). A pesar de esto, la taxonomía de este último permaneció en controversia, hasta que en 1998 se reconoció que *B. equi* no pertenecía a dicho género debido a la identificación en su ciclo biológico de una nueva etapa extraeritrocitaria que tiene lugar en las células mononucleares de sangre periférica del caballo, lo que dio lugar a su inclusión en el género *Theileria* como *Theileria equi* (Mehlhorn and Schein, 1998).

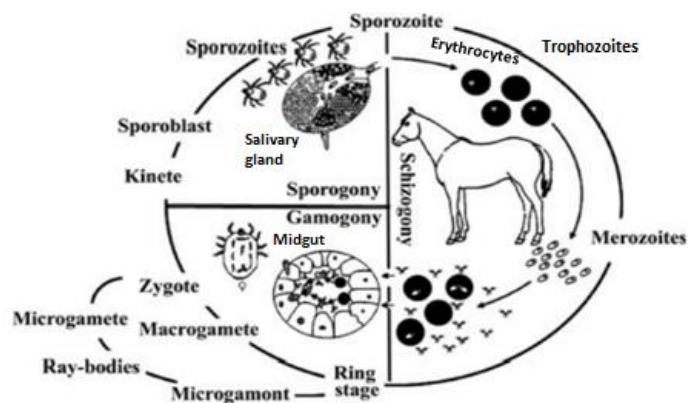
En los dos últimos años se han descrito nuevas especies pertenecientes al género *Theileria* gracias al análisis microscópico y molecular: *Theileria haneyi* n. sp en caballos (Knowles et al., 2018) y *Theileria lupei* n. sp en garrapatas y marsupiales originarios de Australia (Barbosa et al., 2019). Sin embargo, un reciente estudio afirma que para la identificación de nuevos patógenos se debe también tener en cuenta el desarrollo de éstos en cultivos *in vitro* y el tipo de signos clínicos que originan (Uilenberg et al., 2018).

Los ciclos biológicos tanto de *T. equi* como de *B. caballi* incluyen tres etapas: una primera reproducción asexual (esporogonia) en las glándulas salivares de la garrapata, una segunda reproducción asexual (esquizogonia o merogonia) en los eritrocitos del hospedador vertebrado y una reproducción sexual (gametogonia) en el intestino de la garrapata (Wise, 2014).

1.2.1.1 Ciclo biológico de *Babesia caballi*

El ciclo biológico (Figura 1) comienza con la introducción de esporozoítos de *B. caballi* a través de la saliva de una garrapata infectada en el momento en que ésta se alimenta de la sangre de un equino susceptible. Una vez dentro del hospedador vertebrado, los esporozoítos invaden directamente los eritrocitos donde se diferencian primero en trofozoítos y posteriormente en merozoítos, los cuales se reproducen asexualmente produciendo la ruptura del eritrocito y su diseminación a la circulación sanguínea (De Waal, 2004; Rothschild, 2013). En este punto del ciclo algunos de los merozoítos se van a poder diferenciar en gametos, por lo que ambas fases parasitarias (merozoítos y gametos) pueden ser ingeridas por una garrapata cuando ésta realice su alimentación. Posteriormente, en el interior del intestino medio de la garrapata tiene lugar la gametogonia y formación del cigoto. Finalmente, el cigoto invade las glándulas salivares donde se desarrollan los esporoblastos, encontrándose los esporozoítos infectantes en la saliva. Además de invadir las glándulas salivares, el cigoto puede desplazarse hasta los ovarios de la garrapata infectando así las glándulas salivares del embrión. Una vez que la larva eclosione se desarrollarán los esporozoítos en su saliva (Holbrook et al., 1968; Jalovecka et al., 2018).

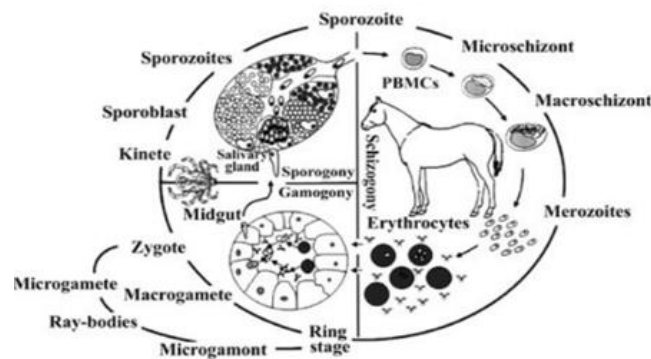
Figura 1. Ciclo biológico de *Babesia caballi* en el vector y en el hospedador vertebrado.



1.2.1.2 Ciclo biológico de *Theileria equi*

Este ciclo biológico (Figura 2) es similar al anterior salvo por la ausencia de transmisión vertical y la existencia de una etapa extraeritrocitaria (Mehlhorn and Schein, 1998). Una vez dentro del hospedador vertebrado, los esporozoítos invaden primero las células mononucleares de sangre periférica (CMSP: macrófagos, linfocitos y monocitos) donde ocurre la esquizogonia dando lugar inicialmente a micro y macroesquizontes y posteriormente a merozoítos. Estos últimos invaden los eritrocitos y son liberados por toda la circulación sanguínea continuando con su ciclo biológico (Jalovecka et al., 2018; Rothschild, 2013).

Figura 2. Ciclo biológico de *Theileria equi* en el vector y en el hospedador vertebrado.



1.2.2 Transmisión

La principal vía de transmisión de la PE es a través de garrapatas duras o ixódidas pertenecientes a los géneros *Dermacentor*, *Hyalomma* y *Rhipicephalus*, las cuales actúan como vectores biológicos de esta enfermedad (De Waal, 1992). Recientemente se han considerado otros géneros transmisores como *Ixodes*, *Haemaphysalis* y *Ambloyomma* (Scoles and Ueti, 2015). Normalmente, las garrapatas en los équidos se localizan en las orejas y divertículo nasal, pudiéndose encontrar también en cabeza, cuello, pecho, axilas y región perineal en casos de infestación masiva (Pfeifer Barbosa et al., 1995). Hasta el momento, las siguientes especies de garrapatas han sido descritas como posibles transmisoras de esta enfermedad en España: *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes ricinus*, *Haemaphysalis punctata*, *Hyalomma marginatum* y *Haemaphysalis inermis* (Cordero del Campillo et al., 1974; Nagore et al., 2004). Aunque en general, *T. equi* y *B. caballus* comparten los mismos vectores, la capacidad de transmisión de estos parásitos puede variar entre las distintas especies de garrapatas (Tabla 3) (Scoles and Ueti, 2015).

Tabla 3. Garrapatas transmisoras de PE: localización geográfica y piroplasma equino transmitido.

Espece de Garrapata*	Localización geográfica	Patógeno transmitido
G° Dermacentor		
<i>D. reticulatus</i> (= <i>D. pictus</i>)? (= <i>D. marginatus</i>) (= <i>D. niveus</i>)?	Europa, Norte de África y Rusia	<i>T. equi</i> <i>B. caballi</i>
<i>D. nuttalli</i>	China, Mongolia	<i>T. equi</i> <i>B. caballi</i>
<i>D. nitens</i>	América del Norte, Central y del Sur	<i>B. caballi</i>
<i>D. silvarum</i>	Ucrania, Rusia	<i>T. equi</i> <i>B. caballi</i>
G° Hyalomma		
<i>H. marginatum</i>	Costa mediterránea, Norte de África	<i>T. equi</i> <i>B. caballi</i>
<i>H. anatolicum</i>	Costa mediterránea, Norte de África	<i>T. equi</i> <i>B. caballi</i>
<i>H. truncatum</i>	África, Asia	<i>B. caballi</i>
<i>H. scupense</i> (= <i>H. uralense</i>) (= <i>H. volgense</i>) (= <i>H. detritum</i>)?	Oeste de Europa, Este de China y Norte de África	<i>T. equi</i> <i>B. caballi</i>
<i>H. lusitanicum</i>	Costa mediterránea	<i>T. equi</i>
G° Rhipicephalus		
<i>R. bursa</i>	Europa, Norte de África	<i>T. equi</i> <i>B. caballi</i>
<i>R. sanguineus</i>	Europa, Asia, África	<i>T. equi</i> <i>B. caballi</i>
<i>R. evertsi</i> (= <i>R. evertsi evertsi</i>)	África	<i>T. equi</i> <i>B. caballi</i>
<i>R. microplus</i>	América del Sur	<i>T. equi</i>
G° Ixodes		
<i>I. ricinus</i>	Europa	<i>T. equi</i>
G° Haemaphysalis		
<i>H. longicornis</i>	Japón	<i>T. equi</i> <i>B. caballi</i>
G° Ambloyomma		
<i>A. cajennense</i>	América del Norte	<i>T. equi</i>

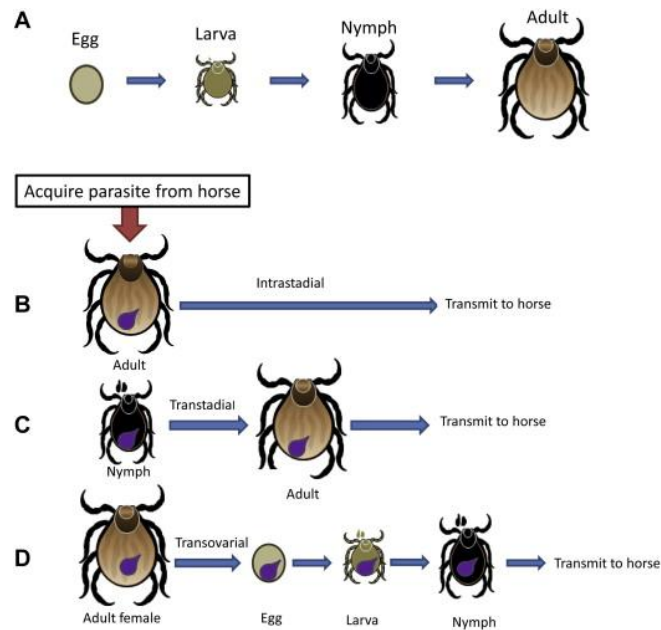
*En esta columna los paréntesis indican otros nombres que han aparecido en la literatura. El signo = precede a los nombres que se utilizaron con anterioridad en otros estudios. El signo ? indica que el nombre de la especie puede considerarse no válido o que existe incertidumbre taxonómica.

Fuente: Rothschild (2013) y Scoles and Ueti (2015).

Es importante tener en cuenta que la presencia de individuos infectados y de vectores competentes en una misma área no siempre dará lugar a casos de PE, ya que otros factores como la abundancia de dichos vectores, su distribución, el clima y la época del año, tienen influencia en la transmisión de dicha enfermedad (Sonenshine, 1991; Thompson, 1969). En los últimos años se ha puesto en duda la especificidad de los piroplasmas por su correspondiente hospedador. Así, se han identificado piroplasmas propios de la especie canina (*Babesia canis*), de los cérvidos (*Babesia capreoli*) y del ganado bovino (*Babesia bovis*, *Theileria sergenti*, *Theileria buffeli*) en caballos (Criado-Fornelio et al., 2003a; Criado et al., 2006; Moretti et al., 2010; Zanet et al., 2017). Por otro lado, se ha descrito al perro como posible reservorio y animal centinela de piroplasmas equinos (Beck et al., 2009; Criado-Fornelio et al., 2004; Rosa et al., 2014) y bovinos (Salim et al., 2019); además de una presencia mayoritaria de *B. caballi* en camélidos en Jordania (Qablan et al., 2012) y en el sur de Irak (Jasem et al., 2015).

El ciclo biológico de las garrapatas incluye cuatro estadios (huevo, larva, ninfa y adulto) y la transmisión de los piroplasmas equinos dentro de las garrapatas puede ocurrir de tres formas distintas (Figura 3): intraestadial (tanto la adquisición como la transmisión de los parásitos ocurren en un mismo estadio), transestadial o interestadial (la adquisición tiene lugar en un estadio y la transmisión por los siguientes, estando presente el parásito durante el desarrollo de la garrapata) y transovárica (las hembras son capaces de transmitir la infección a la descendencia) (Sonenshine, 1991). *T. equi* puede transmitirse vía intra y transestadial (Scoles et al., 2011), mientras que *B. caballi* es principalmente transmitido vía transovárica, pudiendo también utilizar la vía transestadial (De Waal, 1990).

Figura 3: Ciclo biológico (A) y formas de transmisión de las garrapatas: intraestadial (B), transestadial (C) y transovárica (D).

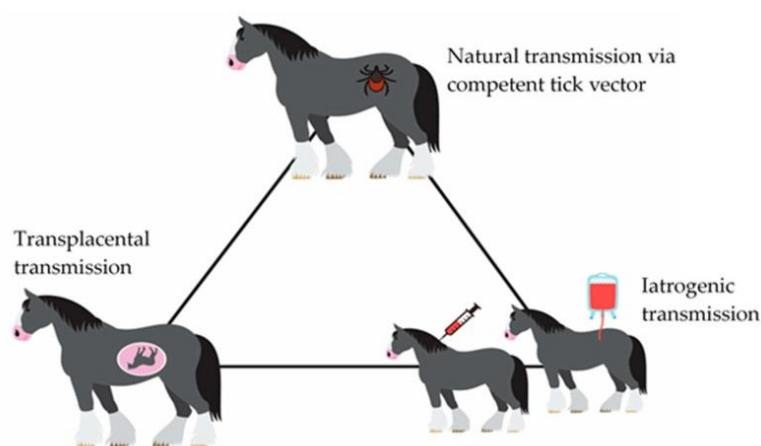


Ambos parásitos también se pueden transmitir accidentalmente vía iatrogénica debido a la utilización compartida de instrumentos contaminados (agujas, jeringas, tubos nasogástricos, material dental y quirúrgico) entre animales susceptibles y parasitados (De Waal, 2004; Friedhoff and Soule, 1996). Las infecciones también pueden deberse a la utilización de animales crónicamente infectados como donantes de sangre; lo que resultó ser la causa de un brote de PE ocurrido en Florida en el 2008 como consecuencia de la práctica ilegal del dopaje (Onyiche et al., 2019; Short et al., 2012).

Por último, varios estudios han demostrado una transmisión transplacentaria de yeguas y mulas a sus fetos, asociada principalmente a *T. equi* (Francoso et al., 2018; Georges et al., 2011; Sant et al., 2016). Dado que la producción de anticuerpos por el feto no ocurre hasta los 240 días de gestación, esta transmisión tiene lugar durante el periodo de nutrición histiotrófica (días 40 a 150 de gestación), en el cual los eritrocitos

parasitados de la madre pueden atravesar la placenta con el fin de aportar una fuente de hierro al feto (Allsopp et al., 2007). La placenta epiteliocorial de las yeguas no permite el paso de anticuerpos de la madre al feto, por lo que la ingestión de calostro en el momento de su nacimiento es esencial para el fortalecimiento de su sistema inmune (Allsopp et al., 2007). En la mayoría de los casos, la transmisión transplacentaria de estos parásitos deriva en aborto, aunque también pueden nacer potros portadores clínicamente sanos o potros débiles que presentan anemia e ictericia graves y mueren a las pocas horas de nacer (Phipps and Otter, 2004; Wise et al., 2013). Sin embargo, un estudio reciente desarrollado en Israel ha demostrado que dicha transmisión en yeguas portadoras de *T. equi* no es una causa común de aborto ni de aparición de infecciones en potros neonatos debidas a este parásito (Tirosh-Levy et al., 2020a). Además, en áreas donde la PE es endémica, la aparición de ictericia severa en potros recién nacidos puede ser diagnosticada como isoeritrolisis neonatal, enfermedad inmunológica debida a la producción en las yeguas preñadas de anticuerpos contra los glóbulos rojos del feto (Georges et al., 2011). Las posibles rutas de transmisión de la PE se han ilustrado en la Figura 4.

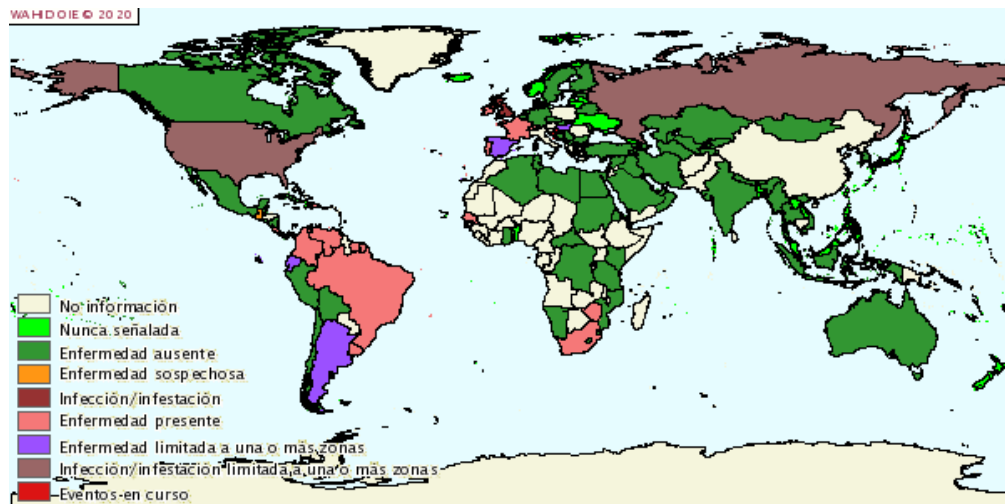
Figura 4. Posibles rutas de transmisión de la PE.



1.2.3 Epidemiología

Según datos de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), la PE es una enfermedad endémica en regiones tropicales, subtropicales y de climas templados, donde las garrapatas vectores están presentes. Asia, América Central y del Sur, África y el sur de Europa y de EEUU estarían incluidas dentro de estas regiones. Sin embargo, países como Canadá, EEUU, Islandia, Reino Unido, Irlanda, Japón, Nueva Zelanda, Australia y Singapur se consideran libres de PE (Rothschild, 2013). En la página web de la OIE se puede encontrar información actualizada sobre la distribución mundial de la PE (OIE, 2020) (Figura 5). La mayoría de los países libres presentan un clima adecuado para el desarrollo de los vectores; es por esto que existen una serie de medidas para evitar la entrada de caballos y garrapatas infectadas (Harland et al., 2011; Wise, 2014). Además, Butler et al. (2012) pusieron de manifiesto que las garrapatas podrían ser transportadas por animales salvajes o aves migratorias.

Figura 5. Distribución global de la PE en el año 2019.



Fuente: Interfaz WAHIS de la OIE. Datos recogidos de enero a junio del 2019.

Aunque en general ambos parásitos comparten los mismos vectores, *T. equi* tiene una distribución geográfica más amplia que *B. caballi* (Bruning, 1996). Los brotes de enfermedad aguda no son frecuentes en áreas endémicas, sino que suceden en la mayoría de los casos cuando un caballo nativo de un área libre es introducido en un área endémica (Knowles, 1988). En áreas libres de PE se han registrado casos esporádicos atribuidos principalmente a la utilización compartida de material veterinario contaminado (Friedhoff et al., 1990).

A continuación, se recogen algunos datos de seroprevalencia (Tabla 4) y de prevalencia (Tabla 5) de PE publicados en los últimos 10 años (2009-2019) en estudios llevados a cabo en distintos países del mundo y utilizando diferentes métodos de diagnóstico.

Tabla 4. Estudios de seroprevalencia de PE publicados en distintos países del mundo.

País	Año	Técnica diagnóstica	Hospedador	Tamaño de la muestra	Prevalencia PE (%)	Prevalencia T. equi/B. caballi (%)	Referencia
Francia	2015	FC	Caballo	443	-	58.0/12.9	Guidi et al. (2015)
Suiza	2010	IFI	Caballo	689	7.3	4.4/1.5	Sigg et al. (2010)
Italia	2011	IFI	Caballo	294	8.5	8.2/0.3	Grandi et al. (2011)
Italia	2014	IFI	Burro	203	57.1	44.3/35.5	Piantadosi et al. (2014)
Grecia	2010	cELISA	Caballo/Mula/Poni	544	11.6	11.0/2.2	Kouam et al. (2010)
Italia	2016	cELISA	Caballo	673	-	39.8/8.9	Bartolome Del Pino et al. (2016)
Etiopía	2013	IFI	Burro	395	59.0	55.7/13.2	Gizachew et al. (2013)
Egipto	2016	IFI	Caballo/Burro	139	48.9	26.6/22.3	Mahmoud et al. (2016)
Kenia	2015	cELISA	Burro	314	81.2	81.2/0.0	Oduori et al. (2015)
Nigeria	2016	cELISA	Caballo	252	-	77.8/4.8	Mshelia et al. (2016)
Turquía	2009	IFI	Caballo	125	18.4	12.8/9.6	Karatepe et al. (2009)
Arabia Saudí	2012	IFI	Caballo	241	-	10.4/7.5	Alanazi et al. (2012)
Tailandia	2014	IFI	Caballo/Mula	240	-	8.7/5.0	Kamyngkird et al. (2014)
Mongolia	2013	iELISA	Caballo	250	81.6	19.6/51.6	Munkhjargal et al. (2013)
China	2014	iELISA	Caballo	1990	-	11.5/51.2	Wang et al. (2014)
India	2016	cELISA	Caballo/Burro/Mula	180	-	73.9/1.1	Sumbria et al. (2016a)
Indonesia	2018	iELISA	Caballo	235	8.5	2.1/6.4	Nugraha et al. (2018)
Irak	2019	cELISA	Caballo/Burro/Mula/Poni	349	39.0	20.9/11.2	Aziz and Al-Barwary (2019)
México	2012	IFI	Caballo	248	61.7	45.2/27.4	Cantu-Martinez et al. (2012)
Venezuela	2013	cELISA	Caballo	694	50.2	14.0/23.2	Rosales et al. (2013)
Costa Rica	2015	cELISA	Caballo	130	95.4	88.5/69.2	Posada-Guzman et al. (2015)

Tabla 5. Estudios de prevalencia de PE publicados en distintos países del mundo.

País	Año	Técnica diagnóstica	Hospedador	Tamaño de la muestra	Prevalencia PE (%)	Prevalencia (%) T. equi/B. caballi	Referencia
Holanda	2012	PCR-RLB	Caballo	300	1.6	1.6/0.0	Butler et al. (2012)
Hungría	2013	PCR	Caballo	101	49.0	49.0/-	Farkas et al. (2013)
Italia	2015	qPCR	Burro	138	21.0	17.4/3.6	Laus et al. (2015)
Italia	2016	qPCR	Caballo	273	-	70.3/10.3	Bartolome Del Pino et al. (2016)
Bosnia	2016	PCR	Caballo	142	25.4	22.5/2.1	Davitkov et al. (2016)
Reino unido	2019	nPCR	Caballo	1242	0.8	0.8/0.0	Coultous et al. (2019b)
Túnez	2013	RLB	Caballo	104	12.5	11.5/1.0	Ros-García et al. (2013)
Egipto	2016	nPCR	Caballo/Burro	139	56.8	38.8/18.0	Mahmoud et al. (2016)
Jordania	2013	nPCR	Caballo/Burro/Mula	288	27.1	18.8/7.3	Qablan et al. (2013)
Mongolia	2013	nPCR	Caballo	250	51.2	6.4/42.4	Munkhjargal et al. (2013)
Irán	2014	PCR	Caballo	240	-	10.8/5.8	Malekifard et al. (2014)
India	2016	PCR	Caballo/Burro/Mula	180	14.1	14.1/0.0	Sumbria et al. (2016a)
Turquía	2017	PCR	Caballo	125	8.8	8.8/0.0	Güven et al. (2017)
Indonesia	2018	nPCR	Caballo	235	2.1	0.4/1.7	Nugraha et al. (2018)
Filipinas	2018	nPCR	Caballo	105	-	24.8/1.9	Ybanez et al. (2018)
China	2019	nPCR	Caballo	242	31.0	30.2/2.9	Wang et al. (2019a)
Brasil	2012	nPCR	Burro	88	-	31.8/20.4	Machado et al. (2012)
Venezuela	2013	PCR	Caballo	136	66.2	61.8/0.0	Rosales et al. (2013)
Costa Rica	2015	nPCR	Caballo	130	66.2	46.2/20.0	Posada-Guzman et al. (2015)
Cuba	2018	nPCR	Caballo	100	78.0	73.0/25.0	Díaz-Sánchez et al. (2018)
Brasil	2018	nPCR	Caballo	90	24.4	18.9/5.5	Vieira et al. (2018)

En EEUU se implantó un programa exhaustivo de vigilancia de PE después de que en 1960 fueran diagnosticados los primeros casos relacionados con la introducción de caballos desde Cuba, declarándose país libre de esta enfermedad en 1988 (Holbrook, 1969). Para el mantenimiento de este estatus el Servicio de Sanidad Animal del Departamento de Agricultura de los EEUU (APHIS, USDA) implantó una serie de restricciones relacionadas con la importación de caballos desde países endémicos. Desde entonces solo se han identificado casos esporádicos (debido principalmente a la entrada ilegal de caballos). En 2008 tuvo lugar un brote en Florida y en 2009 otro en Missouri asociados a la práctica ilegal del dopaje y al uso de agujas contaminadas en carreras de caballos, respectivamente (Short et al., 2012). En 2009, otro brote fue identificado en Texas, pero en este caso las garrapatas fueron las responsables de la transmisión (Scoles et al., 2011; Ueti et al., 2012).

En Australia, *T. equi* fue introducido entre los años 50 y 80 debido a caballos importados desde Texas y España. Sin embargo, este parásito no consiguió establecerse en la población de caballos autóctonos australianos (Ellis, 2000; Mahoney et al., 1977).

1.2.4 Patogénesis e Inmunidad

Algunos detalles sobre la patogénesis de la PE permanecen aún sin resolver. La presencia tanto de *T. equi* como de *B. caballi* produce una alteración en la composición de lípidos y proteínas de la membrana eritrocitaria y un aumento de los niveles de malondialdehído en el plasma sanguíneo (Ambawat et al., 1999; Wise et al., 2013). Esto tiene como resultado una acumulación de iones oxidativos, dando lugar a una lisis de los eritrocitos con salida masiva de merozoítos (anemia hemolítica intravascular) así como a una eliminación por el bazo de los eritrocitos parasitados (anemia hemolítica extravascular) (Donnelan, 2009). La hemólisis provoca una disminución del hematocrito, presencia de hemoglobina en orina y un aumento de la bilirrubina indirecta (no conjugada) en sangre, la cual se deposita en las superficies mucosas dando color amarillo a los tejidos (ictericia) (Allen et al., 1975a). Los eritrocitos no parasitados también son eliminados de la circulación sanguínea, pero la causa a este fenómeno permanece desconocida (Wise, 2014). La presencia de estos parásitos en la sangre también puede causar trombocitopenia y un aumento del tiempo de coagulación (Allen et al., 1975b). Se han descrito varias hipótesis para explicar el descenso de plaquetas en sangre: secuestro de éstas por el bazo, destrucción inmuno-mediada y exceso en su consumo (coagulación intravascular diseminada local y sistémica) (Wise, 2014). Por otro lado, también se ha descrito la aparición de vasculitis en vasos sanguíneos de pequeño tamaño debido a la formación de microtrombos, fenómeno principalmente asociado a la presencia de *B. caballi* (de Waal et al., 1987).

El papel que tiene el sistema inmune en la PE no es muy conocido y no existen evidencias de inmunidad cruzada entre ambos parásitos (Donnelan, 2009). Se cree que en áreas endémicas la inmunidad es adquirida después de la infección inicial y permanece presente debido a la continua exposición a estos parásitos (Rothschild, 2013). Una vez el animal ha contraído la infección, ésta puede ser eliminada de forma

natural gracias a su inmunidad innata o por la aplicación de un tratamiento adecuado (Friedhoff and Soule, 1996). Sin embargo, en la mayoría de los casos, una vez que el animal ha superado la fase aguda de la enfermedad, éste se convierte en portador asintomático de estos parásitos, estatus con una duración de hasta 4 años (*B. caballi*) o de por vida (*T. equi*), estando dichos parásitos acantonados en capilares sanguíneos, vasos del sistema nervioso central o médula ósea (Holbrook, 1969; Maurer, 1962; Pitel et al., 2010). En varios experimentos con caballos esplenectomizados se ha visto que éstos desarrollan un mayor grado de parasitemia y no son capaces de controlar la infección, por lo que se asumió que la inmunidad innata tiene un papel muy importante en el control de la PE ya que el bazo es el encargado de eliminar dichos agentes parasitarios. Sin embargo, la función exacta de los neutrófilos, macrófagos y células *natural killer* (NK) no está bien definida (Ahmed, 2002; Kuttler et al., 1986). Hanafusa et al. (1998) documentaron en una infección experimental que el óxido nítrico producido por los macrófagos puede ser de ayuda para eliminar *B. caballi*.

A pesar de que la respuesta inmune innata constituye la primera barrera para la lucha contra *T. equi* y *B. caballi*, la respuesta inmune adaptativa es esencial para el control de infecciones producidas por *T. equi*, lo que se demostró en potros con una falta de linfocitos B y T maduros (síndrome de inmunodeficiencia combinada severa) (Knowles et al., 1994). Weiland (1986) indicó que el título de anticuerpos y el nivel de parasitemia en équidos no parecen estar directamente relacionados. Sin embargo, Kumar et al. (2002) mostró justo lo contrario. Los caballos infectados con *T. equi* desarrollan anticuerpos contra proteínas de superficie de los merozoítos (EMA-1 y EMA-2 – *equi merozoite antigens* -) que pueden detectarse a los 7 - 11 días post-infección (Knowles et al., 1992; Knowles et al., 1991; Tenter and Friedhoff, 1986). De las 7 IgGs que han sido descritas en el genoma equino, las IgG1, 4 y 7 se desarrollan durante la fase aguda de la infección y las IgG3 y 5 durante la fase crónica (Cunha et al., 2006). En caso de *B. caballi*, los anticuerpos son producidos contra

proteínas apicales del merozoíto (RAP-1 y Bc48 – *rhoptry associated protein* -), y el factor de necrosis tumoral α y otras citoquinas podrían ayudar a neutralizar la infección (Hanafusa et al., 1998; Kappmeyer et al., 1999). Tanto EMA-1,-2 como RAP-1 y Bc48 son proteínas utilizadas en el diagnóstico serológico de la PE (Huang et al., 2003; Ikadai et al., 1999; Kumar et al., 2015). Los anticuerpos pueden ser transferidos de madres a potros vía calostro, otorgando protección a éstos en sus primeros 5 a 9 meses de vida (Donnelly et al., 1982; Onyiche et al., 2019). Cuando el título de anticuerpos decrece, los potros serán susceptibles a la infección y en caso de que residan en zonas endémicas es muy probable que la infección se produzca antes de los 2 años de edad (Wise et al., 2013).

1.2.5 Manifestaciones clínicas

Las infecciones por *T. equi* y/o *B. caballi* normalmente dar lugar a manifestaciones clínicas similares. Sin embargo, en la mayoría de la literatura se describe que *T. equi* tiende a causar signos clínicos más graves que *B. caballi* (Maurer, 1962).

En general, el periodo de incubación de la PE tras la picadura de una garrapata es de 7 a 22 días, pudiendo variar de 12 a 19 días en el caso de infecciones debidas a *T. equi* y de 10 a 30 días en el caso de *B. caballi* (Ali et al., 1996).

1.2.5.1 Signos clínicos

Los signos clínicos van a variar en función de si la PE se manifiesta de forma hiperaguda, aguda, subaguda o crónica (Rothschild, 2013).

La forma hiperaguda es la menos frecuente y en la mayoría de los casos los caballos suelen encontrarse muertos o moribundos. Esta forma se manifiesta normalmente en caballos que han sido introducidos en áreas donde existe una gran cantidad de garrapatas infectadas, en caballos

adultos portadores que han sido sometidos a un ejercicio muy intenso o a los 2-3 días de vida en potros infectados vía transplacentaria (Hailat et al., 1997; Maurer, 1962; Phipps and Otter, 2004). Los animales afectados no van a mostrar ningún tipo de signo clínico previo, sino que tiene lugar una rápida obstrucción de los capilares por los eritrocitos parasitados derivando en enfermedad hepática y/o renal, coagulopatía intravascular y por consiguiente fallo multiorgánico y muerte del animal (Donnelan, 2009).

La infección aguda se caracteriza por la aparición de signos variables y no específicos: desde fiebre (normalmente superior a los 40°C), letargia, anorexia y edema en extremidades hasta petequias en membranas mucosas (tercer párpado incluido), mucosas pálidas o ictericas, elevación de la frecuencia cardiaca y respiratoria, hemoglobinuria y/o bilirrubinuria (Taylor et al., 1969; Zobba et al., 2008). Otras complicaciones menos frecuentes son: neumonía, edema pulmonar, cólico, impactación, diarrea, enteritis catarral y signos nerviosos (encefalitis y ataxia) (De Waal, 2004). En este caso, los signos clínicos pueden derivar en mortalidad si no se aplica un tratamiento adecuado.

Los caballos con PE subaguda manifiestan fiebre transitoria y distintos grados de anorexia, pérdida de peso, edema periférico, taquicardia, taquipnea y disminución del rendimiento. Dependiendo del grado de anemia, el color de las membranas mucosas puede variar desde rosa o amarillo pálido a amarillo brillante, con aparición de petequias y equimosis ocasionales. La orina puede tener desde un color amarillo oscuro hasta marrón o rojo. También pueden manifestarse signos de cólico y de constipación seguidos de diarrea. En esta forma el bazo se encuentra normalmente dilatado, llegando a ser palpable por vía rectal. Sin tratamiento estos caballos tienen riesgo de desarrollar una anemia severa (Rothschild, 2013).

Los caballos infectados crónicamente presentan una historia de signos clínicos no específicos, entre los que se incluyen ligera inapetencia, pérdida de peso, baja tolerancia al ejercicio, condición corporal

deficiente y malestar. No suelen manifestarse signos de anemia y si se manifiestan suelen ser muy leves. Sin embargo, la esplenomegalia es muy frecuente (Wise, 2014).

Es importante resaltar que la mayoría de los caballos infectados no manifiestan ninguna de las cuatro formas clínicas anteriores, sino que son portadores inaparentes de esta enfermedad. Estos caballos no presentan signos clínicos evidentes y tienen bajos niveles de parasitemia en sangre, lo que hace que se comporten como diseminadores potenciales de los piroplasmas equinos si son usados como donantes de sangre o si son introducidos en zonas donde las garrapatas transmisoras están presentes. Es por esto que los caballos portadores representan la principal amenaza para la entrada de la PE en países libres de esta enfermedad (Ueti et al., 2008; Wise et al., 2014). Algunos estudios han revelado que si los caballos portadores son sometidos a situaciones de estrés (procedimientos quirúrgicos, ejercicio intenso) o inmunosupresión (administración de corticoides, vacunación) pueden desarrollar signos clínicos debido a un aumento de la parasitemia (Hailat et al., 1997; Oladosu, 1988; Oladosu and Olufemi, 1992). Sin embargo, un reciente estudio, cuyo objetivo era demostrar si distintas situaciones de estrés afectaban a los niveles de parasitemia de *T. equi* en caballos con una PE subclínica, concluyó que dichas situaciones podían agravar los signos clínicos si el animal se había infectado recientemente pero no provocaban un aumento de los niveles de *T. equi* si la infección estaba ya instaurada (Tirosh-Levy et al., 2020b). Las yeguas portadoras también pueden transmitir la infección a sus potros durante la gestación (Lewis et al., 1999).

1.2.5.2 Alteraciones hematológicas

La anemia, como resultado de la hemólisis de los glóbulos rojos, es la alteración hematológica más frecuente. Se trata de una anemia regenerativa, la cual en una etapa inicial de la enfermedad va a ser normocítica y normocrómica pero pasará a ser macrocítica cuando el número de reticulocitos aumente (Onyiche et al., 2019). Las alteraciones más frecuentes de la serie roja incluyen una disminución del número de glóbulos rojos, de la hemoglobina y del hematocrito (Osman, 2017). Por el contrario, el volumen corpuscular medio (VCM), la hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) pueden mostrar unos resultados variables (Ambawat et al., 1999). El recuento de plaquetas se va encontrar también por debajo de sus niveles normales (Zobba et al., 2008). En cuanto a la serie blanca, en fases agudas de la enfermedad se han descrito casos de neutropenia y linfopenia con posible desviación a la izquierda (Rudolph et al., 1975). Posteriormente, tras 10 días de infección, tiene lugar la aparición de linfocitosis (Taylor et al., 1969).

1.2.5.3 Alteraciones bioquímicas

La literatura recoge variaciones en los niveles de parámetros bioquímicos ya que éstos se ven afectados por una serie de factores propios del animal: estado de hidratación, ejercicio, nutrición y presencia de infecciones concomitantes (Onyiche et al., 2019). Taylor et al. (1969) describieron un descenso del hierro, fósforo y fibrinógeno. Además, también se ha demostrado un incremento de los niveles de bilirrubina total (BT), urea, aspartato aminotransferasa (AST), gamma glutamil transferasa (GGT), fosfatasa alcalina (ALP) y lactato deshidrogenasa (LDH) y una disminución de las proteínas totales y de la albúmina (Camacho et al., 2005; Hailat et al., 1997). La elevación de enzimas hepáticas en suero se ha atribuido a la degeneración centrolobulillar y necrosis de los

hepatocitos, ambas producidas por la reducción del flujo de sangre al hígado (Zobba et al., 2008).

1.2.5.4 Hallazgos patológicos

La sangre de los animales que padecen PE presenta con frecuencia un aspecto diluido. Se puede observar esplenomegalia y hepatomegalia y hemorragias en epicardio, miocardio y endocardio. Los riñones también van a estar aumentados de tamaño y van a presentar petequias y una coloración más clara de lo normal. Además, podemos encontrar líquido en pleura, pericardio y peritoneo (Ueti, 2018).

En cuanto a las lesiones histopatológicas, se ha descrito una congestión visceral generalizada, degeneración vacuolar de los haces musculares miocárdicos, necrosis centrolobulillar del hígado, microtrombos en vasos pulmonares y necrosis tubular en la zona medular de los riñones (De Waal, 2004).

1.2.6 Diagnóstico

Debido a que los signos clínicos de la PE no son patognomónicos, el diagnóstico definitivo debe realizarse mediante pruebas en el laboratorio. La utilización de un test u otro dependerá de la fase en la que se encuentre la infección, los signos clínicos manifestados y de si el animal reside en una zona endémica o libre de PE.

1.2.6.1 Diferencial

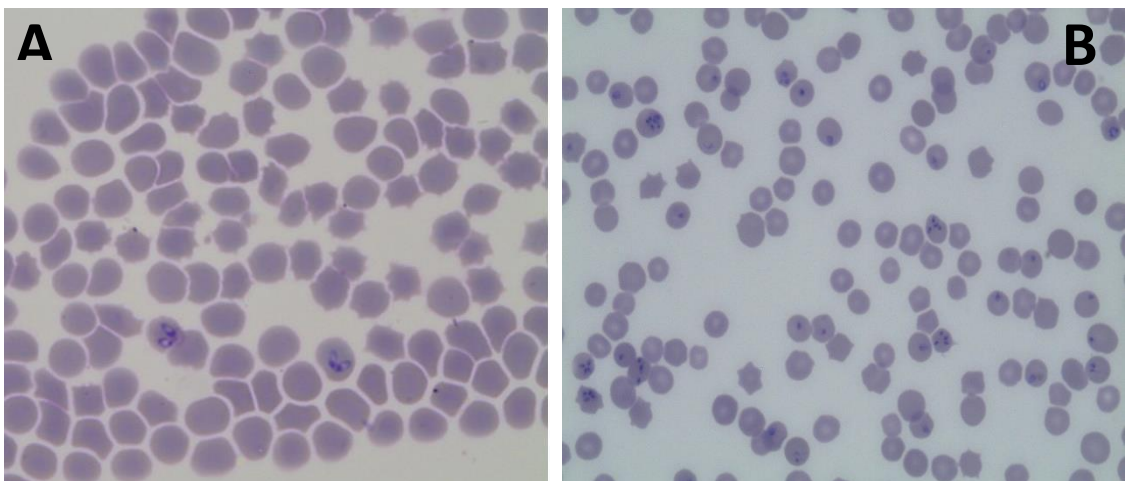
El diagnóstico diferencial de la PE incluye enfermedades como: anemia infecciosa equina (AIE), arteritis vírica equina (AVE), anaplasmosis/ehrlichiosis, surra, durina, purpura hemorrágica, peste equina africana y algunos casos de intoxicación (Rothschild, 2013; Wise, 2014).

1.2.6.2 Directo

1.2.6.2.1 Microscópico

La visualización microscópica de los piroplasmas equinos en frotis de sangre teñidos es útil solo durante la fase aguda de la infección. Los frotis son teñidos con Giemsa o Diff-Quick y visualizados con un microscopio óptico bajo el objetivo de inmersión. La observación directa también puede hacerse a partir de improntas de órganos (cerebro, riñón, hígado, pulmones). Con frecuencia el número de parásitos en sangre es muy bajo, incluso en infecciones graves, lo que puede dar lugar a resultados falsos negativos. *B. caballi* es más difícil de detectar que *T. equi* ya que el porcentaje de eritrocitos parasitados es de apenas un 1%. En infecciones debidas a *T. equi* dicho porcentaje es mayor (1 - 5%), pudiendo alcanzar el 20% en casos muy graves de PE (Ali et al., 1996). En el frotis, los merozoítos de *B. caballi* tienen una forma piriforme, una longitud de 2 a 5 μm y aparecen en parejas unidos por sus extremos terminales (Malekifard et al., 2014) (Figura 6A); mientras que los merozoítos de *T. equi* son de menor tamaño (2-3 μm), con forma piriforme, ovalada o circular, y algunos de ellos dispuestos en forma de tétrada ("cruz de Malta") (Schein et al., 1981) (Figura 6B).

Figura 6. Frotis sanguíneo de un caballo parasitado con *Babesia caballi* (A) y con *Theileria equi* (B) (Diff-Quick, 100x).



1.2.6.2.2 Molecular

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que detecta la presencia de ADN de estos parásitos, es el método diagnóstico más rápido y con mayor sensibilidad y especificidad. Pese a estas ventajas, no se ha estandarizado el uso de esta técnica debido a la gran variedad genética encontrada en los aislados de *T. equi* y *B. caballi* en todo el mundo (Bhoora et al., 2009; Bhoora et al., 2010c; Bhoora et al., 2010d). La PCR puede usarse junto con la microscopía para la detección de los parásitos en fases agudas de la enfermedad y junto con la serología para la identificación de animales portadores. También se utiliza para confirmar la eliminación de los piroplasmas después de la aplicación de un tratamiento (Ali et al., 1996). Se ha visto que, a pesar de que después del tratamiento la PCR sea negativa, los niveles de anticuerpos en el caso de infección por *B. caballi* no comienzan a disminuir hasta los 3 a los 15 meses, mientras que en caso de *T. equi* descienden a partir de los 24 meses (Kuttler et al., 1988; Weiland, 1986). La razón de la persistencia de los anticuerpos es desconocida, pero podría estar relacionada con su producción mantenida por los linfocitos B de memoria (Bernasconi et al., 2002).

Con el fin de determinar la situación epidemiológica de la PE se han empleado distintos tipos de PCR tales como: convencional (Motloang et al., 2008), anidada (nPCR) (Hall et al., 2013), a tiempo real (qPCR) (Bhoora et al., 2010a) y el ensayo de hibridación reversa en línea (*reverse line blot (RLB) hybridization*) (Ros-Garcia et al., 2013). Además, se han desarrollado recientemente ensayos de PCR a tiempo real de tipo *multiplex* que permiten la detección específica y simultánea de *T. equi* y *B. caballi* (Bhoora et al., 2018; Lobanov et al., 2018). Con respecto a la efectividad de estos ensayos algunos autores han manifestado que la PCR anidada y la PCR a tiempo real son capaces de detectar un mayor número de caballos infectados en comparación con la PCR convencional (Alanazi et al., 2014; Nicolaiewsky et al., 2001). Otra técnica molecular que ha mostrado una alta sensibilidad y rapidez es la amplificación isotérmica [*loop-mediated isothermal amplification (LAMP)*] (Notomi et al., 2015), la cual fue empleada por Alhassan et al. (2007) demostrando una mayor

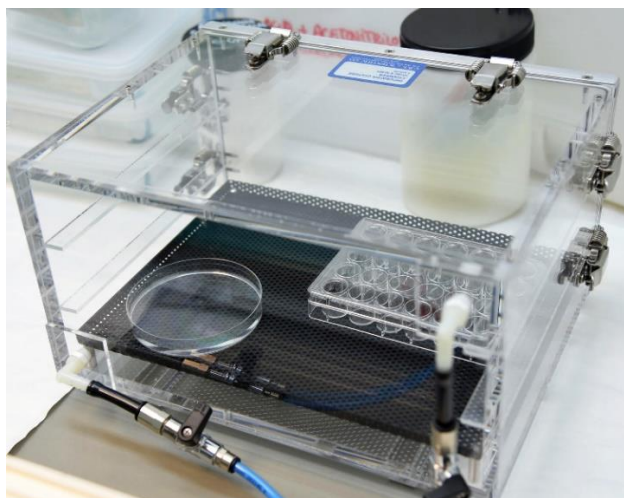
eficiencia de la misma con respecto a la PCR convencional y los cultivos *in vitro*.

1.2.6.2.3 *In vitro*

El cultivo *in vitro* de los piroplasmas equinos es una técnica que fue descrita en el año 1981 (Schein et al., 1981). Los primeros datos sobre el cultivo específico de *B. caballi* y de *T. equi* se remontan a los años 1993 (Holman et al., 1993) y 1994 (Holman et al., 1994), respectivamente. Desde entonces y hasta el año 2002 se han publicado varios estudios con el fin de conseguir una mejora de esta técnica (Holman et al., 1997; Zweygarth et al., 2002b; Zweygarth et al., 1999).

Para la realización de estos cultivos es necesario disponer de una sala limpia destinada exclusivamente para tal fin. El cultivo se inicia con eritrocitos procedentes de una muestra de sangre, en la cual se retiran las células blancas y el plasma sanguíneo. Los eritrocitos se incuban en distintas placas de cultivo celular con un medio específico para cada parásito. Dichas placas se introducen en distintas cámaras incubadoras, las cuales se llenan con una mezcla de gases (O₂, CO₂ y N) específica para cada parásito, simulando la mezcla de gases sanguíneos (Figura 7). Por último, las cámaras se guardan en una estufa húmeda de CO₂ con el fin de conseguir una atmósfera controlada. Una vez iniciados los cultivos, se debe cambiar el medio diariamente y hacer un seguimiento del crecimiento y la multiplicación de los parásitos mediante la visualización de éstos en un frotis sanguíneo una vez a la semana. El tiempo de crecimiento de los parásitos dependerá del porcentaje de eritrocitos parasitados existente inicialmente, pudiendo variar desde dos semanas hasta un mes.

Figura 7. Cultivo *in vitro*: placa de cultivo celular en cámara incubadora con mezcla de gases.



Pese a que el cultivo *in vitro* es una alternativa a la utilización de animales *in vivo*, resulta laboriosa, costosa e inconsistente. Es por esto que actualmente solo se utiliza con fines de investigación: identificación complementaria de individuos portadores, evaluación de la efectividad de fármacos antiparasitarios, caracterización molecular de aislados de campo y producción de antígenos específicos para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y vacunas (Bhoora et al., 2018; Gimenez et al., 2018; Zweygarth et al., 1997; Zweygarth et al., 2002a).

1.2.6.3 Indirecto

Los test serológicos fueron desarrollados para aumentar la sensibilidad en el diagnóstico de la PE, especialmente en animales portadores. Dentro de estos test se incluyen: la fijación de complemento (FC), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo de inmunoenzimático de competición (cELISA), entre otros.

1.2.6.3.1 Serología mediante fijación del complemento (FC)

La FC se basa en la activación del complemento durante la interacción antígeno – anticuerpo (Bruning, 1996). Este método fue el recomendado por la OIE hasta el año 2005 para el análisis de caballos con destino a países libres de PE (OIE, 2018). Actualmente, esta prueba solo está indicada para el diagnóstico de PE en casos agudos ya que, aunque tiene una alta especificidad, presenta una baja sensibilidad en la detección de caballos portadores o con una PE crónica (Knowles et al., 1992). Esto se debe a que la isoforma IgG5, producida en fases crónicas, no es capaz de fijar el complemento (Lewis et al., 2008; McGuire et al., 1971). Con la FC se pueden detectar anticuerpos IgM en los 8 - 11 días post-infección aproximadamente, los cuales comienzan a disminuir a los 2 - 5 meses (Bose et al., 1995; Tenter and Friedhoff, 1986). Algunas desventajas derivadas del uso de esta técnica son: resultados falsos negativos, alto coste en la producción de antígeno y reactividad cruzada entre *T. equi* y *B. caballus* (Bruning, 1996; Donnelly et al., 1982).

1.2.6.3.2 Serología mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La IFI también está recomendada solo en procesos agudos, aunque presenta mayor sensibilidad que la anterior y los títulos de anticuerpos permanecen elevados durante más tiempo que en la FC (Bruning, 1996). Es capaz de detectar seroconversión en los 3 a 20 días post-infección y se utiliza como método de apoyo a la FC y al cELISA (Tenter and Friedhoff, 1986). En esta técnica, la unión antígeno - anticuerpo se pone de manifiesto con el uso de dos anticuerpos: el anticuerpo primario que reconoce y se une al antígeno, y el anticuerpo secundario (anti-inmunoglobulina de caballo) marcado con un fluorocromo, que reconoce al primario y se une a él emitiendo fluorescencia. Una muestra es considerada positiva si emite fluorescencia a una dilución $\geq 1:80$. Algunos de los inconvenientes de la IFI son: prolongado tiempo de desarrollo, necesidad de grandes cantidades de antígeno y subjetividad en la interpretación de resultados (Bruning, 1996).

1.2.6.3.3 Serología mediante ELISA de competición (cELISA)

A día de hoy, el cELISA es considerado el test más sensible para el diagnóstico de PE en caso de infección crónica o inaparente (Bruning et al., 1997), estando indicado para el diagnóstico de la PE en análisis previos a la exportación (OIE, 2018). Este test está basado en el uso de proteínas recombinantes antigénicas [EMA-1 (*T. equi*) y RAP-1 (*B. caballi*)] y de anticuerpos monoclonales específicos para el epítipo de dichas proteínas (Kappmeyer et al., 1999), y se comercializa actualmente por la empresa VMRD (Pullman, WA, USA) bajo los nombres de *Theileria equi* y *Babesia caballi* Antibody Test Kits. EMA-1 posee un epítipo inmunodominante y altamente conservado, lo que hace posible la detección de múltiples aislados de *T. equi* en todo el mundo (Knowles et al., 1992). Sin embargo, el epítipo de RAP-1 utilizado presenta diferencias genéticas entre los aislados de *B. caballi*, razón por la que este test resultó ser incapaz de detectar todos los caballos con PE en Sudáfrica (Bhoora et al., 2010d). Para resolver dicho problema y

conseguir mejores resultados diagnósticos, Rapoport et al. (2014) sugirieron el empleo de antígenos específicos de los distintos aislados de *B. caballi* encontrados en las diferentes partes del mundo. El cELISA detecta seroconversión a los 21 días (infección experimental) o a las 5 semanas (transmisión por garrapatas) (Knowles et al., 1992). También se han observado casos de reactividad cruzada entre ambos parásitos (Bruning, 1996).

1.2.6.3.4 Otras técnicas serológicas

Otra técnica ELISA menos utilizada para el diagnóstico de PE es el ELISA de tipo indirecto (iELISA), el cual utiliza las proteínas recombinantes EMA-2 (*T. equi*) y Bc48 (*B. caballi*) para detectar la presencia de anticuerpos frente a dichos parásitos, demostrando una gran especificidad y sensibilidad en los primeros estudios desarrollados por Ikadai et al. (1999) y Huang et al. (2003). En los últimos años también se han desarrollado tests inmunocromatográficos basados en distintas proteínas recombinantes (EMA-1, EMA-2 y Bc48) para la rápida detección de estos anticuerpos en campo. Estos tests mostraron una elevada concordancia con la técnica ELISA (Huang et al., 2004; Song et al., 2020; Wang et al., 2019b).

Por último, el Western blot (o inmunoblot) es otra técnica de inmunodiagnóstico que ha sido destinada solo a la investigación de *T. equi* y *B. caballi*, pero que actualmente está siendo utilizada en EEUU para el diagnóstico complementario de la infección por *B. caballi*, y validada para confirmar la eliminación de *T. equi* tras la aplicación de un tratamiento (APHIS, 2020).

1.2.7 Tratamiento

El tratamiento tiene objetivos diferentes dependiendo de si el animal reside en un país libre o en un país endémico de PE. En países libres, el principal objetivo es la eliminación de estos parásitos del torrente sanguíneo para así evitar la presencia de animales portadores y por consiguiente una posible transmisión de esta enfermedad. Sin embargo, en países endémicos se busca la supresión de los signos clínicos manifestados durante la infección aguda y la disminución del tiempo de recuperación de los caballos. En estos países, la completa eliminación de los parásitos en caballos portadores no sería recomendable ya que se ha demostrado que la infección crónica confiere inmunidad a largo plazo (Wise et al., 2014).

Se han probado varios fármacos tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo el dipropionato de imidocarb (DI) (Imizol®), administrado de forma intramuscular, el que presenta una mayor eficacia en la eliminación de ambos parásitos (Ueti et al., 2012). En general, las infecciones debidas a *T. equi* son más difíciles de tratar que las debidas a *B. caballi*. Se ha observado que en algunos casos *B. caballi* puede ser eliminado por el propio animal sin la aplicación de un tratamiento (De Waal, 1992). Hines et al. (2015) observaron que distintos aislados de *T. equi* mostraban una susceptibilidad variable frente al DI. Para la eliminación de *T. equi* estarían recomendadas cuatro dosis de 4 mg/kg cada 72 horas y en caso de *B. caballi*, dos dosis de 2.2 mg/kg cada 24 horas (Grause et al., 2013; Schwint et al., 2009). El DI, además de provocar toxicidad hepática y renal, tiene actividad anticolinesterasa, pudiendo dar lugar a efectos secundarios tales como: agitación, sudoración, cólico y diarrea (Adams, 1981; Meyer et al., 2005). La administración de glicopirrolato (0.005 mg/kg) o atropina (0.1 mg/kg) por vía intravenosa pueden ayudar a prevenir los efectos adversos anteriores (Ueti et al., 2012). La administración de DI en burros debe ser limitada ya que estos animales son extremadamente sensibles a este fármaco (Frerichs et al., 1973; Singh, 1980). Por otro lado, el DI puede provocar abortos en yeguas gestantes y está presente en la leche 2 horas después de su administración en yeguas en lactación, pero se desconoce si en este caso puede provocar toxicidad en potros lactantes (Belloli et al.,

2002; Lewis et al., 1999). En cuanto a la eficacia de DI en potros neonatos con PE solo se ha publicado un estudio en el que se logró la recuperación de los mismos mediante la administración de DI junto con la oxitetraciclina (Silvey, 1996).

Otros fármacos utilizados en el tratamiento de la PE son el diminazeno aceturato (Berenil®) y el diminazeno diaceturato. Un estudio llevado a cabo por Rashid et al. (2008), utilizando dos dosis de 3.5 mg/kg cada 48 horas para ambos fármacos, demostró una eficacia mayor para el diminazeno aceturato, describiendo también daño muscular severo debido a su administración intramuscular. La oxitetraciclina intravenosa (Terramicina Q-100®), a una dosis diaria de 5-6 mg/kg durante 7 días, ha resultado ser efectiva frente a *T. equi* pero no frente a *B. caballi* (Carbrey et al., 1971). Por otro lado, el tratamiento con buparvaquona (Butalex®), fármaco con poder theilericida administrado vía intravenosa a una dosis diaria de 4-6 mg/kg durante 3 días consecutivos, logró la resolución de los signos clínicos, pero no la eliminación completa de *T. equi*. La combinación de este fármaco con DI y otros medicamentos ha dado buenos resultados en el tratamiento de la infección por *T. equi* (Bruning, 1996; Kumar et al., 2003). En España, el uso de la buparvacuona ha estado únicamente aprobado por medio del régimen de prescripción excepcional, comúnmente conocido como la "cascada de prescripción" (Vet+i, 2015). Sin embargo, en el pasado año la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) emitió un informe en relación con los principales vacíos tanto profilácticos como terapéuticos en las distintas especies animales, en el cual dicho fármaco se incluyó como posible tratamiento de la theileriosis producida por *T. equi* (AEMPS, 2019).

Otros compuestos capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de los piroplasmas equinos son el ketoconazol, el artesurato y la camptotecina, entre otros (Bork et al., 2003; Nagai et al., 2003; Tayebwa et al., 2018).

1.2.8 Control y prevención

La PE está incluida en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la OIE; organización que dicta las recomendaciones para el movimiento de caballos desde países endémicos de PE a países libres de esta enfermedad. Estas recomendaciones, que incluyen un periodo de cuarentena y la realización de determinados análisis durante el mismo, son distintas dependiendo del país de destino. En la página web del MAPA se pueden consultar los requisitos que los caballos deben cumplir para su exportación a terceros países (MAPA, 2020a). Actualmente, un gran número de caballos exportados desde España tienen como destino los Estados Unidos de América. Estos caballos deben cumplir un periodo de cuarentena en nuestro país y certificar los siguientes requisitos: no exposición a enfermedades contagiosas en los 60 días anteriores a la exportación, no vacunación en los 14 días previos a la exportación, ausencia de ectoparásitos y de cualquier signo clínico de enfermedad infectocontagiosa el día del embarque y resultado negativo a metritis contagiosa equina (solo para reproductores P.R.E). Una vez el caballo llega a EEUU se somete a una cuarentena en la cual debe resultar serológicamente negativo a PE, AIE, muermo y durina. Si la serología resulta positiva, el caballo es regresado a su país de origen, siendo el dueño el responsable de los gastos del viaje (Harland et al., 2011).

El uso de desinfectantes no es efectivo contra la propagación de las infecciones transmitidas por garrapatas. Sin embargo, la revisión diaria de los animales, la limitación de acceso a los pastos, la eliminación de las garrapatas utilizando acaricidas y la protección frente a éstas mediante el uso de repelentes, resulta fundamental para hacer frente a la PE. El uso de acaricidas debe ser controlado ya que pueden desarrollarse resistencias (George et al., 2002). También es importante prevenir la vía iatrogénica de transmisión, usando material desechable y evitando el uso compartido de agujas y jeringas (Short et al., 2012; Ueti, 2018).

Aunque el uso de vacunas para proteger de la PE ha sido probado experimentalmente en burros dando buenos resultados, a día de hoy no hay vacunas completamente efectivas para prevenir la infección por ninguno de estos parásitos (Kumar et al., 2002).

En regiones endémicas se asume que la inmunidad adquirida por la infección inicial aporta un cierto grado de protección frente a la exposición constante a los vectores transmisores de PE. En España, aunque el análisis rutinario oficial de esta enfermedad no sea obligatorio, cualquier caso positivo debe ser comunicado a la Oficina Comarcal Agraria de la región donde dicho caso haya sido detectado. Esta información se utilizará para la emisión de informes relativos a la situación epidemiológica actual de la PE y a posibles brotes de la misma.

1.2.9 Factores de riesgo asociados

Numerosos estudios, además de determinar el nivel de exposición a la PE, han identificado varios factores de riesgo asociados con dicha exposición. Un mayor conocimiento de estos factores es fundamental para reconocer la población de equinos en riesgo y poder así reducir y controlar la infección mediante la aplicación de medidas de control más eficientes y el diseño e implementación de un programa apropiado de vigilancia.

En la tabla 6 se recogen algunos estudios en los que se han identificado factores de riesgo asociados y no asociados a una mayor probabilidad de infección de PE.

Tabla 6. Factores de riesgo asociados y no asociados con una mayor infección de PE.

Estudio	País	Tamaño de la muestra	Factores de riesgo	No factores de riesgo
Kouam et al. (2010)	Grecia	544	▪Especie equina: mula ▪Actividad: agrícola y recreación ▪↑ edad ▪Región geográfica: Tesalia	▪Sexo
Sevinc et al. (2008)	Turquía	481	▪Sexo: macho ▪Actividad: deporte ▪Raza: árabe	-
Rosales et al. (2013)	Venezuela	694	▪Acceso a pasto ▪Contacto con ganado	-
Karatepe et al. (2009)	Turquía	125	▪↑ edad (<i>B. caballi</i>) ▪Región geográfica: Ulukisla	▪Sexo ▪Edad (<i>T. equi</i>)
Abutarbush et al. (2012)	Jordania	253	▪Acceso a pasto	▪Actividad ▪Desparasitación ▪Contacto con otros animales
Vieira et al. (2013)	Brasil	198	▪Área rural ▪↑ edad	▪Sexo ▪Presencia de garrapatas
Dos Santos et al. (2011)	Brasil	714	▪↓ condiciones higiénico-sanitarias ▪Altitud <500m ▪Región geográfica: Itaguaí	▪Especie equina ▪Edad, sexo, actividad ▪Contacto con ganado
Ribeiro et al. (2013)	Portugal	162	▪Alojamiento externo/mixto	▪Edad, sexo, actividad
Munkhjargal et al. (2013)	Mongolia	250	▪Sexo: macho ▪Mediana edad	▪Región geográfica
Moretti et al. (2010)	Italia	412	▪Sexo: hembra ▪Raza: caballo de tiro italiano ▪Acceso a pasto	▪Edad ▪Actividad
Steinman et al. (2012)	Israel	590	▪Raza autóctona ▪Acceso a pasto ▪Región geográfica: Altos del Golán	▪Edad ▪Sexo

1.2.9.1 Intrínsecos

Uno de los principales factores intrínsecos es la susceptibilidad de las distintas especies de équidos a la PE. En la mayoría de los estudios se ha encontrado una mayor prevalencia de PE en burros y mulas en comparación con los caballos, lo cual es debido a que tanto los burros como las mulas desarrollan principalmente actividades ligadas al campo, teniendo así una mayor exposición a las garrapatas y por lo tanto una elevada probabilidad de contagio (Dos Santos et al., 2011; García-Bocanegra et al., 2013; Kouam et al., 2010).

De forma general, los caballos de mayor edad presentan una prevalencia más alta de *T. equi* y más baja de *B. caballi* (Kouam et al., 2010; Ruegg et al., 2007). Este hecho está relacionado con la posible presencia de por vida de *T. equi* en la sangre, mientras que *B. caballi* permanece en el animal hasta un máximo de 4 años (Wise et al., 2014). Bruning (1996) relacionó la eliminación de *B. caballi* con una mayor madurez del sistema inmune a medida que aumenta la edad de los caballos y Ruegg et al. (2007) consideraron la posibilidad de que la localización de *B. caballi* en los capilares sanguíneos podría enmascarar su supuesta eliminación. Por otro lado, la seropositividad a *T. equi* podría ser también superior en caballos de mayor edad debido a la exposición de éstos a las garrapatas durante un periodo más prolongado (Vieira et al., 2013). Por el contrario, Moretti et al. (2010) y Golynski et al. (2008) no encontraron una influencia de la edad sobre la prevalencia de PE.

Aunque diversos estudios epidemiológicos han intentado establecer una relación entre el sexo (macho entero/hembra/macho castrado) y la prevalencia de PE, los resultados derivados de éstos se han mostrado contradictorios entre sí. Algunos autores han descrito una mayor tasa de infección en las hembras que en los machos (Moretti et al., 2010; Ruegg et al., 2007), mientras que otros han manifestado lo contrario

(Qablan et al., 2013). Estas diferencias pueden deberse al distinto manejo al que están sometidos yeguas y machos: las hembras normalmente se crían en el campo, mientras que los machos son aislados en boxes a partir de los dos años de edad con el fin de evitar cubriciones no controladas o para su entrenamiento y posterior venta. Por otro lado, el estrés al que están sometidos los machos durante su entrenamiento diario puede dar lugar a una inmunosupresión y por consiguiente tener una mayor susceptibilidad al contagio (Salim et al., 2008). Ruegg et al. (2007) describieron que los machos castrados podrían poseer una mayor probabilidad de infección por *T. equi*; resultado que contrasta con el obtenido en un experimento previo donde se encontró que niveles altos de testosterona podrían estar relacionados con una mayor infección por piroplasmas (Hughes and Randolph, 2001a, b). Roberts et al. (2001) también demostraron que los niveles de hormonas sexuales influyen en la prevalencia de protozoos parásitos en machos y hembras. Sin embargo, otros estudios han descrito una ausencia de asociación entre el sexo y la tasa de positividad a PE (Bahrami et al., 2014; Grandi et al., 2011).

La raza y la actividad que desempeña el caballo también podrían tener una influencia en la tasa de infección. Steinman et al. (2012) demostraron distinta susceptibilidad a la PE en función de la raza. Además, se ha descrito que los caballos de raza árabe y los caballos italianos de tiro pesado (TPR), así como aquellos de razas cruzadas, son más propensos a ser positivos a PE (Aharonson-Raz et al., 2014; Bartolome Del Pino et al., 2016; Moretti et al., 2010). Este hecho puede estar relacionado con el diferente manejo y cuidados al que están sometidas las distintas razas; los caballos no cruzados suelen tener mejores cuidados (alojamiento en boxes, cepillado y aplicación de acaricidas) debido a que son caballos cuyo destino suele ser el comercio internacional, el deporte o la competición. De igual forma, los caballos de competición presentan una menor tasa de infección ya que éstos son sometidos a estrictos controles contra la PE (Moretti et al., 2010), a diferencia de los caballos utilizados en actividades agrícolas y recreativas (Kouam et al., 2010).

1.2.9.2 Extrínsecos

La relación entre la prevalencia de PE y algunos factores medioambientales también ha sido estudiada. Esta relación puede aportar un mayor conocimiento sobre la interacción entre hospedador, parásito y medioambiente.

En un estudio llevado a cabo en Italia, se encontró una mayor positividad de PE en zonas situadas a una mayor altitud (Bartolome Del Pino et al., 2016). Sin embargo, en otro estudio en distintas regiones del sureste de Brasil, la prevalencia de *T. equi* fue menor en aquellas regiones situadas a una altitud mayor, hallazgo que fue atribuido a un cambio en el ciclo biológico del vector como consecuencia de las condiciones climáticas presentes en áreas de mayor altitud (Dos Santos et al., 2011). El tipo de clima tiene una influencia en la cantidad de garrapatas y en su disposición, por lo que las regiones geográficas con unas condiciones de temperatura y humedad óptimas para el crecimiento de los vectores presentarán una mayor prevalencia de PE (Pfaffle et al., 2013; Sumbria et al., 2016b). Khajuria et al. (2015) determinaron que el desarrollo y la reproducción de las garrapatas están favorecidos por una alta humedad y temperatura propias de los meses de otoño y verano, respectivamente; mientras que dicho crecimiento se ve disminuido durante los meses de invierno, en los cuales las lluvias no son frecuentes y las temperaturas caen por debajo de los 12°C. Sin embargo, existen evidencias de que las garrapatas pueden sobrevivir a estos meses de frío ocultas en grietas en las paredes. La presencia de cultivos o bosques y el tipo de terreno también han sido identificados como factores de riesgo (Bartolome Del Pino et al., 2016). En años anteriores, Schwarz et al. (2009) discutieron la influencia que tienen estos factores en la distribución de las garrapatas. Un año después, Vanwambeke et al. (2010) revelaron que la presencia de tierras de cultivo tenía un impacto favorable en el control de las enfermedades transmitidas por vectores; lo cual está en consonancia con lo encontrado recientemente por Bartolome Del Pino et al. (2016)

donde una mayor prevalencia de PE fue observada en caballos asentados en áreas forestales.

Debido a la alta exposición a las garrapatas y a que algunas de éstas son transmisoras de enfermedades tanto a los equinos como a otras especies animales, varios estudios han obtenido una mayor tasa de infección de PE en caballos con acceso al pasto, en aquellos que desempeñan actividades agrícolas y en aquellos que residen junto a otros animales domésticos (rumiantes, perros) en las explotaciones (García-Bocanegra et al., 2013; Guidi et al., 2015; Shkap et al., 1998). Así, *Dermacentor reticulatus*, *Ixodes ricinus* y *Rhipicephalus sanguineus*, conocidos vectores de la PE en España, han sido identificados como transmisores de otros patógenos en perros, ovejas y bovinos (Chaligiannis et al., 2018; Schoeman, 2009; Vila et al., 2019). En el continente americano, *Rhipicephalus microplus*, cuyo principal hospedador es el ganado bovino, fue también identificado como vector de la PE (Ueti et al., 2005).

Por otro lado, el empleo de ectoparasiticidas en el animal y de acaricidas en los boxes, patios y otras instalaciones ganaderas serían medidas de control y de prevención que ayudarían a disminuir el riesgo de exposición a los vectores (Dos Santos et al., 2011; Guidi et al., 2015). La importancia de la aplicación de medidas higiénico sanitarias, tanto en la propia explotación como en los animales, se ha visto reflejada en varios estudios donde la presencia de garrapatas se ha asociado con una mayor prevalencia de PE (Peckle et al., 2013; Sumbria et al., 2018). Además, dado que en España el programa de vacunación en equinos incluye la inmunización frente a otras enfermedades infecciosas como herpesvirus tipo 1 y 4, tétanos y gripe equina, García-Bocanegra et al. (2013) revelaron que los caballos sometidos a dicho programa mostraban una menor probabilidad de infección que aquellos no vacunados. Este hallazgo también puede estar relacionado con una mayor atención y mejores cuidados en estos caballos con el fin de minimizar el contacto con las garrapatas.

1.2.10 Filogénesis

La caracterización genética de *T. equi* y *B. caballi* no solo se ha empleado para manifestar la presencia de dichos parásitos, sino que ha hecho posible la identificación de sus distintos genotipos circulantes por todo el mundo, demostrando principalmente la presencia de varios genotipos en una misma población de estudio. Para llevar a cabo dicha identificación se han usado diferentes genes (18S rRNA, EMA-1, RAP-1, β -tubulina, citocromo B mitocondrial (cytB), EMA-2 y Bc48) como dianas en los ensayos moleculares (Battsetseg et al., 2002; Caccio et al., 2000; Criado et al., 2006; Montes Cortes et al., 2019).

El 18S rRNA es el gen más empleado debido a su aparición en múltiples copias dentro del genoma y a la presencia de regiones altamente conservadas en el mismo, lo que proporciona un incremento de sensibilidad a los ensayos moleculares y permite comparaciones filogenéticas significativas (Allsopp and Allsopp, 2006; Hunfeld et al., 2008). Aunque EMA-1 ha sido utilizado en diversos estudios filogenéticos demostrando una gran variedad genética entre los aislados de *T. equi*, el uso de este gen es menos frecuente debido a su aparición en una única copia (Bhoora et al., 2010c; Ketter-Ratzon et al., 2017; Ueti et al., 2003). Por otro lado, para el gen RAP-1 se ha encontrado una menor diversidad genética, lo que probablemente puede deberse a la existencia de un menor número de muestras positivas a *B. caballi* y a la baja parasitemia producida por este parásito (Bhoora et al., 2010d; Rapoport et al., 2014). En cuanto a EMA-2 y Bc48, hasta la fecha se han publicado pocos estudios con el fin de conocer el polimorfismo de estos genes. Aun así, estudios recientes llevados a cabo por Munkhjargal et al. (2013) y Nugraha et al. (2018) han demostrado la existencia de tres grupos o genotipos para EMA-2 y cuatro para Bc48.

El gen β -tubulina se ha utilizado como marcador genético en la identificación de distintos protozoos apicomplexos ya que es uno de los pocos genes de estos parásitos que se encuentra interrumpido por uno o más intrones, estando conservada la posición del primer intrón en

todas las especies (Montes-Cortes et al., 2017). Las variaciones tanto en la longitud como en la secuencia de dichos intrones permiten la identificación de las distintas especies de apicomplexos (Caccio et al., 2000). De acuerdo a Escalante et al. (1998), el *cytB* es un gen multicopia de rápida evolución no sujeto a la acumulación de polimorfismos. Este hecho junto con su localización extracromosómica (DNA episomal) en los parásitos apicomplexos, cuando normalmente su localización es en el ADN mitocondrial, hacen que este gen sea otra posible diana en el estudio de la filogénesis de los géneros *Babesia* y *Theileria* (Criado et al., 2006).

En España, los primeros estudios filogenéticos llevados a cabo en aislados de *T. equi* y *B. caballi* fueron realizados por Criado-Fornelio y colaboradores en 2003 y 2004 utilizando como diana el gen 18S rRNA en el ensayo de PCR (Criado-Fornelio et al., 2004; Criado-Fornelio et al., 2003a). En estos estudios se encontraron dos variantes genéticas (posteriormente denominadas genotipos) para ambos piroplasmas, las cuales compartían un elevado porcentaje de identidad con genotipos que habían sido encontrados en África. Nagore et al. (2004), que realizaron estudios similares utilizando muestras procedentes del norte de España y el ensayo de RLB, identificaron nuevas variantes genéticas que denominaron "*T. equi* – like" y "*B. caballi* - like", además de las ya descritas para ambos parásitos. Posteriormente, Adaszek et al. (2012) encontraron una alta homología entre sus aislados (procedentes del sur de España) y los identificados por Nagore et al. (2004), sugiriendo la circulación de estos genotipos por todo el territorio nacional.

1.2.10.1 *Theileria equi*

Los primeros análisis filogenéticos de *T. equi* basados en el gen 18S rRNA identificaron dos genotipos distintos (A y B) (Nagore et al., 2004). Posteriormente, varios estudios realizados en distintos países revelaron la existencia de tres genotipos distintos en Suráfrica (A, B y C) (Bhoora et al., 2009), cuatro en Sudán (A, B, C y D) (Salim et al., 2010) y hasta cinco en Jordania (A, B, C, D y E) (Qablan et al., 2012). Sin embargo, algunos

autores han sugerido la existencia de solo cuatro genotipos como resultado de la posible combinación del genotipo B y E (Alanazi et al., 2014; Hall et al., 2013).

En vista de la gran diversidad genética encontrada en estudios basados en este gen, algunos autores han intentado demostrar la existencia de un mayor o menor grado de patogenicidad asociado a cada uno de los distintos genotipos. Así, Manna et al. (2018) sugirieron que el genotipo A era mayoritario en caballos con signos clínicos típicos de PE, mientras que en aquellos asintomáticos predominaba el genotipo B.

En relación al gen EMA-1, Bhoora et al. (2010c) evidenciaron la existencia de tres grupos (A, B y C) en la población de équidos de Suráfrica. Sin embargo, años más tarde Munkhjargal et al. (2013) identificaron un nuevo grupo en caballos ubicados en el centro de Mongolia. Recientemente, se han descrito nuevos aislados de *T. equi* pertenecientes a algunos de estos grupos en estudios llevados a cabo en Israel, Palestina y Jordania (Ketter-Ratzon et al., 2017), y en Italia (Manna et al., 2018), revelando una menor diversidad en el gen EMA-1 en comparación con el 18S rRNA.

1.2.10.2 *Babesia caballi*

Posteriormente a la identificación de los dos genotipos de *B. caballi* (A y B) basados en el gen 18S rRNA por Nagore et al. (2004), Bhoora et al. (2009) sugirieron la posible división del genotipo B en dos subgrupos (B1 y B2). Años más tarde el subgrupo B2 fue renombrado como genotipo C en un estudio llevado a cabo en Jordania (Qablan et al., 2013).

Con respecto al gen RAP-1, Bhoora et al. (2010d) describieron la presencia en Suráfrica de dos genotipos (A y B), separando el genotipo B en dos subgrupos (B1 y B2). Después, otro estudio realizado por Rapoport et al. (2014) con secuencias obtenidas en Israel sugirió una

posible división del genotipo A en los subgrupos A1 y A2, demostrando un porcentaje de identidad del 99% con las secuencias surafricanas incluidas en el genotipo A y del 81-82% con aquellas incluidas en el genotipo B procedentes de América. La diversidad genética de RAP-1 también se ha demostrado en estudios llevados a cabo en Brasil (Schein et al., 2018), Nigeria (Sunday Idoko et al., 2020) y en nuestro país (Montes Cortes et al., 2019). Los aislados obtenidos en estos dos últimos estudios fueron similares a los incluidos en el subgrupo A1 por Rapoport et al. (2014), reafirmando así la existencia de los subgrupos A1 y A2, y proponiendo además la división del genotipo B en tres subgrupos (B1, B2 y B3), los cuales contienen secuencias encontradas en distintas regiones de América y Mongolia.

1.2.11 Estudios de piroplasmosis equina en España

Durante décadas se han identificado numerosos casos de PE en España. Sin embargo, las publicaciones de las que disponemos son escasas y en ocasiones éstas no van acompañadas de un estudio riguroso. El primer caso de *T. equi* fue descrito en 1933 en una yegua localizada en Badajoz (Almarza Herranz, 1933). Años más tarde, se confirmó la existencia tanto de *T. equi* como de *B. caballi* en distintas regiones de la península ibérica (Lopez-Abad Ballesteros, 1947; Sadava and Bozal, 1945). Cordero del Campillo et al. (1974) presentaron el primer caso clínico de PE en un caballo utilizado para la producción de sueros hiperinmunes. Dicho animal empezó a presentar signos clínicos compatibles con PE y murió sin dar tiempo a administrar ningún tratamiento. El análisis hematológico reveló un recuento leucocitario aumentado y un recuento eritrocitario disminuido, así como un 41.8% de eritrocitos parasitados por *T. equi*; mientras que el examen histopatológico correspondió con una hepatitis colangiолítica con ictericia. Finalmente se concluyó que se trataba de un caso de PE en un caballo portador asintomático.

Pese a que España es un país endémico de PE, la situación epidemiológica de esta enfermedad solo ha sido estudiada en ciertas CCAA españolas. Así, el primer estudio epidemiológico fue realizado por Habela (1989) en 327 caballos, localizados en distintos municipios de Extremadura, utilizando la técnica de IFI. Se demostró una seropositividad a PE del 77.1% (*T. equi*: 64.2%; *B. caballi*: 28.1%) y la existencia de infecciones mixtas (15.3%). Además, se llevó a cabo un seguimiento de la cinética de anticuerpos frente a *T. equi* en 3 caballos tratados con Berenil®. Aunque durante dicho periodo el título de anticuerpos descendió, éste siguió siendo positivo; demostrándose así la ineficacia de este fármaco para eliminar por completo dicho parásito de la sangre. En 1999 se publicó otro estudio con el objetivo de demostrar la presencia de anticuerpos frente a *T. equi* y/o *B. caballi* en 11 yeguas en régimen extensivo en Badajoz y en los potros nacidos de aquellas yeguas seropositivas (Coletto and Etienne, 1999). Se utilizó la IFI como técnica serológica, testándose los potros a los 2 - 30 días de vida y al mes siguiente del primer test. Ningún animal fue positivo a *B. caballi*; mientras que 7 yeguas, 6 potros (1º test) y 1 potro (2º test) fueron seropositivos a *T. equi*, resultando más bajo el título de anticuerpos en los potros que en las yeguas. Debido a que con el paso del tiempo la mayoría de los potros perdieron los anticuerpos, se sugirió la existencia de una inmunidad pasiva de anticuerpos maternos, pero no de una infección *in utero*.

Camacho et al. (2005) desarrollaron un estudio en Galicia con el fin de conocer la seroprevalencia de PE en 60 caballos sin signos clínicos y sin un historial indicativo de haber sufrido esta enfermedad (grupo control). Como método diagnóstico se utilizó la IFI, la cual reveló que el 40.0% de los caballos eran positivos a *T. equi*, el 28.3% a *B. caballi*, y el 20.0% a ambos protozoos. Además, se compararon los parámetros hematológicos y bioquímicos entre los caballos que resultaron seropositivos y los no seropositivos y entre el grupo control y 36 caballos con signos clínicos de PE en los cuales la presencia de *T. equi* y/o *B. caballi* fue detectada mediante frotis sanguíneo. Los caballos

seropositivos a *T. equi* presentaron un valor de hematocrito significativamente más bajo que los seronegativos. Sin embargo, en los caballos parasitados, además de un descenso del hematocrito, se encontraron menores niveles de glóbulos rojos, hemoglobina y plaquetas y un aumento de los valores de bilirrubina, urea y enzimas hepáticas.

En Andalucía se han llevado a cabo dos estudios con el fin de determinar tanto la prevalencia como la seroprevalencia de PE en caballos, burros y mulas aparentemente sanos. Adaszek et al. (2012) encontraron material genético de *T. equi* y/o *B. caballi* en un 20.0% (*T. equi*: 17.0%; *B. caballi*: 3.0%) de los 135 animales estudiados, hecho relacionado con el estado de portador inaparente de la PE. También compararon las secuencias obtenidas en este estudio con aquellas ya publicadas en estudios previos en España, observando que las secuencias de *B. caballi* eran similares a las encontradas por Nagore et al. (2004) en el País Vasco. Sin embargo, las secuencias de *T. equi* mostraron una homología menor: del 99.8% y del 98.2% con las secuencias publicadas por Nagore et al. (2004) y Criado et al. (2006), respectivamente; lo que sugiere la circulación de diferentes genotipos en todo el territorio nacional. Por otro lado, García-Bocanegra et al. (2013) estudiaron el nivel de exposición frente a PE en 537 équidos y los factores de riesgo asociados con dicha enfermedad. La seroprevalencia de PE fue estimada en un 53.3% (*T. equi*: 50.3%; *B. caballi*: 11.4%), siendo ésta significativamente mayor en las mulas (*T. equi*: 66.1%; *B. caballi*: 32.1%), en comparación con la estimada en los caballos (*T. equi*: 48.6%; *B. caballi*: 7.9%) y burros (*T. equi*: 47.2%; *B. caballi*: 17.0%). El incremento de la edad del animal, la presencia de garrapatas y la entrada de nuevos caballos a la explotación en los últimos 6 meses fueron factores de riesgo asociados con un incremento de la seropositividad. Sin embargo, la vacunación y el resguardo de los animales en boxes podrían ayudar a controlar la infección.

En el año 2017 y 2019 se publicaron las últimas investigaciones relacionadas con la situación epidemiológica de la PE en nuestro país. Montes Cortes et al. (2017) estudiaron la seroprevalencia de la PE en

3100 caballos de distintas razas localizados en varias CCAA del centro y suroeste de la península. Utilizando la técnica IFI se encontró que un 52.4% de los animales presentaban anticuerpos frente a *T. equi* y/o *B. caballi* y que aproximadamente la mitad de los caballos P.R.E analizados eran seropositivos (50.9%). La seroprevalencia de *T. equi* fue mayor que la de *B. caballi* (44.5% vs 20.7%) y un 12.8% de los caballos mostraron infecciones mixtas. Una mayor probabilidad de padecer esta enfermedad se asoció de forma significativa con caballos de 3 a 12 años de edad, de razas mixtas y no autóctonas y con aquellos ubicados en Castilla y León y Extremadura (solo *T. equi*); mostrando esta última CCAA una seropositividad para *B. caballi* significativamente menor en relación al resto de comunidades. Otras características intrínsecas del animal como el color de la capa y el sexo no fueron identificados como factores de riesgo. Este estudio también llevó a cabo una comparación entre las dos técnicas serológicas más empleadas para el diagnóstico de la PE: IFI y cELISA. Aunque la concordancia entre ambas técnicas fue muy similar, ésta fue mayor para *T. equi* que para *B. caballi*, sugiriendo que la detección de un menor número de animales positivos mediante el cELISA podría deberse a la variabilidad genética del gen RAP-1 usado en dicho test, presentando éste una baja especificidad con los genotipos de *B. caballi* existentes en España, lo cual sería responsable de resultados falsos negativos.

Finalmente, Montes Cortes et al. (2019) estudiaron la prevalencia de caballos portadores de PE en muestras de sangre de 235 caballos asintomáticos localizados en explotaciones de Extremadura y Castilla y León. Estos autores desarrollaron una PCR multi-anidada basada en 7 genes diana (*T. equi*: 18S rRNA, EMA-1, β -tubulina, cytB); *B. caballi*: 18S rRNA, RAP-1 y β -tubulina), considerándose un caso como positivo cuando al menos uno de estos 7 genes fuese amplificado. La prevalencia de PE fue del 72.8% (*T. equi*: 66.0%; *B. caballi*: 29.4%), además de que un 22.6% de los caballos mostraron infecciones mixtas. La mayoría de las muestras positivas a *T. equi* (91.6%) amplificaron para el gen β -tubulina; mientras que fue para el gen RAP-1 (75.4%) en el caso

de *B. caballi*. El análisis filogenético de las secuencias de este último gen reveló una homología del 100% con secuencias identificadas en Israel. Estas 235 muestras también fueron analizadas por cELISA obteniéndose una seroprevalencia total de 62.6% (*T. equi*: 61.7%; *B. caballi*: 3.8%) e infecciones mixtas en solo 7 caballos. El análisis estadístico reveló que solo el incremento de la edad estaba asociado a una mayor probabilidad de infección por *T. equi*. Por último, al comparar los resultados obtenidos por estas dos técnicas, se encontró una baja concordancia en el diagnóstico de *B. caballi*, reafirmando la existencia de resultados falsos negativos con el cELISA.

1.2.12 Impacto económico mundial y en España

Dado que la PE está presente en todo el mundo y que los países libres de esta enfermedad solo permiten la entrada de caballos seronegativos, la PE representa un problema global para el movimiento internacional de caballos con destino venta o participación en las distintas competiciones o eventos ecuestres (Wise et al., 2013). La introducción de caballos positivos a PE en países libres y su presencia en países endémicos provoca graves pérdidas económicas ligadas a una disminución drástica del valor del propio animal, a una restricción de movimientos y al coste de las medidas necesarias para el control de la enfermedad (test diagnósticos, detección de caballos portadores, tratamiento y aplicación de programas de desinfección y desinsectación). Otras pérdidas económicas serían las relacionadas con los abortos en yeguas y la disminución del rendimiento en caballos de competición (Rothschild, 2013).

En España, Habela et al. (2005) cifraron las pérdidas económicas ligadas a la PE en las yeguas de caballos P.R.E entre 9.000 y 18.000 euros. Estas pérdidas se debían tanto a los gastos derivados del diagnóstico, prevención y tratamiento de la PE (y a veces de la mortalidad ocasionada) como de la obtención de licencias para el comercio intra y extracomunitario. Años más tarde, un estudio relativo al impacto del sector ecuestre en España realizado por Deloitte (2013)

determinó que las actividades relacionadas con dicho sector suponen un impacto económico de más de 5.300 millones de euros, lo cual representa el 0.51% del PIB español. Las fases de cría y transformación de los caballos fueron estimadas en más de 542 y 462 millones de euros, respectivamente, siendo la fase de explotación la que supone un mayor movimiento económico (1.698 millones de euros aproximadamente). Esta última fase incluye, entre otras actividades, el movimiento geográfico de los caballos para su uso en actividades recreativas o su participación en concursos o eventos. Por otro lado, la compra-venta de caballos superó los 403 millones de euros, de los cuales 58 millones derivaban de la exportación de éstos a terceros países. El caballo P.R.E es la principal raza exportada desde España (1.452 caballos exportados en 2012), con un valor medio por exportación de 40.000 euros (Deloitte, 2013). Teniendo en cuenta estas cifras, que la PE es endémica en España y que dicha enfermedad es una de las principales restricciones para el movimiento internacional de caballos, la existencia de caballos positivos a PE en España tiene un elevado impacto negativo en el sector equino no solo debido a las pérdidas económicas asociadas a la imposibilidad de la exportación sino también debido a aquellas relacionadas con la inversión realizada en la cría y entrenamiento de estos caballos. En el año 2018, la Subdirección General de Productos Ganaderos estimó en cerca de 3 millones de euros el valor de las exportaciones de équidos vivos a países extracomunitarios.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Theileria equi y *Babesia caballi* son parásitos obligados intraeritrocitarios, conocidos como piroplasmas, que solo causan enfermedad a los équidos. La importancia de la piroplasmosis equina radica en que la mayoría de los animales que se recuperan de la infección quedan como portadores asintomáticos comportándose como fuente de infección para otros équidos (Wise et al., 2014). La mayoría de los estudios llevados a cabo en países endémicos de PE han demostrado una (sero)prevalencia de *B. caballi* menor que de *T. equi*, siendo este último responsable de una infección mucho más severa.

Pese a que esta enfermedad es endémica en España desde hace décadas, Habela et al. (2005) revelaron que, aunque la PE es conocida por la mayoría de los ganaderos, solo un 22% de los mismos tienen constancia de poseer caballos portadores crónicos en sus explotaciones (cuando las cifras de prevalencia de PE obtenidas en estudios publicados a lo largo de estos años son muy superiores) y que la mayoría de los casos de PE son diagnosticados por los veterinarios de la explotación en base a la sintomatología clínica sin recurrir a los métodos laboratoriales para determinar la(s) especie(s) de piroplasma(s) implicada(s) con objeto de prescribir el tratamiento específico, ya que éste difiere según se trate de una infección por *T. equi* o *B. caballi*.

Además, hasta la fecha solo han sido publicados estudios relativos a la situación epidemiológica de la PE en determinadas regiones de la península, no existiendo en la bibliografía un estudio a nivel nacional en el que se determine el nivel de exposición de la población de caballos de toda España a los piroplasmas equinos. Dichos estudios regionales sugieren que un porcentaje elevado de equinos presentan anticuerpos frente a uno o ambos piroplasmas y que existe un gran número de caballos que actúan como portadores asintomáticos durante largos periodos de tiempo. Estos hallazgos hacen que la PE esté relacionada con elevadas pérdidas económicas para el sector equino español debido a que esta enfermedad

limita la exportación de caballos a países libres de PE, los cuales no permiten la entrada de animales seropositivos. Este problema es especialmente importante en los caballos P.R.E ya que son los que poseen un mayor censo poblacional, representando el 85% de los caballos de raza pura en España y casi el 100% de las exportaciones a América y Europa.

En relación a los resultados de los estudios regionales, Camacho et al. (2005) encontraron un nivel de exposición del 40.0% a *T. equi* y del 28.3% a *B. caballi* en Galicia. Además, corroboraron que la PE causaba daño hepático y anemia hemolítica, siendo ésta más grave en infecciones debidas a *T. equi* que en el caso de *B. caballi*. Este último resultado fue también descrito con anterioridad por Nagore et al. (2004) al realizar un análisis hematológico en 24 caballos con sintomatología compatible con PE. Años más tarde, García-Bocanegra et al. (2013) demostraron una seroprevalencia de PE del 53.3% en caballos, burros y mulas ubicados en Andalucía, resultando dicha seroprevalencia mayor para *T. equi* (50.3%) que para *B. caballi* (11.4%). Aunque en otros países ya se habían publicado estudios que identificaban factores de riesgo asociados a una mayor seroprevalencia de PE, García-Bocanegra et al. (2013) fueron los primeros en realizar esta investigación en España. Así, la presencia de garrapatas fue el único factor de riesgo asociado con una mayor seropositividad a PE. Se relacionó un aumento en el número de casos debidos a *T. equi* con el incremento en la edad de los caballos, y en el caso de *B. caballi* con la especie equina (mulas y burros) y con la entrada de nuevos individuos en la explotación en los últimos 6 meses. El último y mayor estudio de seroprevalencia de PE fue publicado en 2017, incluyendo cinco CCAA de la zona centro y suroeste de España (Madrid, Castilla y León, Castilla La Mancha, Extremadura y Andalucía) (Montes Cortes et al., 2017). La seroprevalencia total fue estimada en un 52.4% (*T. equi*: 44.5%; *B. caballi*: 20.7%), siendo Castilla la Mancha (67.5%) y Madrid (38.1%) las CCAA con el mayor y menor número de caballos seropositivos, respectivamente. Además, se observó que dicha seropositividad era especialmente elevada (50.9%) en los caballos P.R.E y que los caballos de razas no autóctonas, aquellos de edad avanzada y los ubicados en Extremadura y Castilla y León eran más propensos a padecer PE.

En cuanto a la prevalencia de caballos portadores asintomáticos de PE en España, hasta el momento sólo existen dos estudios: uno realizado en Andalucía en el que el 17.0% y el 3.0% de los caballos muestreados fueron positivos para *T. equi* y *B. caballi*, respectivamente (Adaszek et al., 2012), y otro llevado a cabo en Extremadura y Castilla y León en el que se observó una prevalencia de PE del 72.8% (*T. equi*: 66.0%; *B. caballi*: 29.4%) (Montes Cortes et al., 2019). Este último estudio también identificó el aumento en la edad de los caballos como factor de riesgo asociado con un mayor número de casos positivos a *T. equi* y realizó una comparación entre la técnica PCR y el cELISA, sugiriendo que la PCR es más efectiva para la detección de animales portadores (sobre todo en el caso de *B. caballi*).

Por otro lado, se han publicado pocos estudios sobre la diversidad genética de *T. equi* y *B. caballi* existente en España en relación al gen 18S rRNA. Los primeros se remontan a los años 2003 (Criado-Fornelio et al., 2003a, b), 2004 (Criado-Fornelio et al., 2004) y 2006 (Criado et al., 2006), describiéndose la presencia de dos genotipos distintos para dicho gen en ambos piroplasmas equinos. Más recientemente, el estudio anteriormente citado de Adaszek et al. (2012) demostró una homología del 99.8% (*T. equi*) y del 100% (*B. caballi*) entre las secuencias encontradas en el mismo y las identificadas por Nagore et al. (2004) en el País Vasco.

En base a los resultados de los estudios de PE desarrollados en España y descritos anteriormente podemos plantear las siguientes hipótesis:

1. Existe una elevada seropositividad a PE en todo el territorio nacional, siendo la (sero)prevalencia de *T. equi* mayor que la de *B. caballi* y existiendo diferencias en la (sero)prevalencia entre las distintas CCAA.
2. La mayor seropositividad a PE se relaciona con el incremento de la edad de los caballos, la presencia de garrapatas, la entrada de nuevos caballos a la explotación y con los caballos P.R.E y aquellos de razas no autóctonas.

3. Un gran número de caballos actúan como portadores asintomáticos de estos piroplasmas equinos.
4. Los caballos parasitados por *T. equi* muestran un cuadro clínico más grave que aquellos parasitados por *B. caballi*.
5. La PCR es la técnica más apropiada para detectar la presencia de *T. equi* y *B. caballi* en los caballos con enfermedad aguda.
6. Distintos genotipos de ambos piroplasmas equinos circulan por nuestro país.
7. La PE tiene un impacto económico negativo en la industria equina española.

2.2 Objetivos

El objetivo general del presente trabajo de investigación ha sido el estudio de la situación epidemiológica de la PE en todo el territorio español (incluidas Canarias y las Islas Baleares), destacando la importancia que tiene esta enfermedad en las yeguas dedicadas a la cría de caballos P.R.E y el impacto económico que ocasiona en el sector equino español. También se ha corroborado la importancia de realizar un correcto diagnóstico de PE en caballos con signos clínicos compatibles y se ha investigado la existencia de los distintos genotipos circulantes de *T. equi* y *B. caballi* por todo el territorio nacional.

Para alcanzar dichos objetivos se han llevado a cabo cinco estudios: un estudio piloto (artículo 1), un estudio nacional (artículo 2) y tres estudios complementarios (artículos 3, 4 y 5).

Un conocimiento más completo acerca de dicha situación aportará información esencial para la implementación de medidas eficaces de prevención y control de enfermedades infecciosas en las explotaciones equinas, lo cual resultará en una mejora de las prácticas de manejo equino y del estatus sanitario de los animales y, por consiguiente, en una disminución del riesgo de sufrir esta enfermedad y de las pérdidas económicas derivadas.

Los objetivos principales del trabajo de investigación fueron:

1. Conocer la seroprevalencia de PE (*T. equi* y *B. caballi*) en explotaciones de cría de caballos P.R.E en la zona centro de España (Artículo 1).
2. Determinar la seroprevalencia de PE (*T. equi* y *B. caballi*) en caballos de distintas razas aparentemente sanos distribuidos por todo el territorio nacional, realizando un análisis estratificado por CCAA (Artículo 2).
3. Definir la prevalencia de caballos portadores asintomáticos de PE (*T. equi* y *B. caballi*) residentes en todo el territorio nacional, realizando un análisis estratificado por CCAA (Artículo 2).
4. Describir la presencia de *T. equi* y/o *B. caballi* y de anticuerpos frente a estos, así como de cambios hematológicos y bioquímicos, en caballos con signos clínicos compatibles con PE (Artículo 3).
5. Conocer la seroprevalencia de PE (*T. equi* y *B. caballi*) en caballos con destino exportación (Artículo 4).
6. Investigar la diversidad genética de *T. equi* y *B. caballi* existente en todo el país mediante secuenciación, caracterización molecular y análisis filogenético del gen 18S rRNA (Artículo 5).

Como objetivos secundarios, estarían incluidos:

1. Identificar las características propias de las explotaciones de cría de caballos P.R.E ubicadas en la zona centro de España y de los caballos alojados en las mismas, así como las medidas para la prevención y el control de enfermedades infecciosas aplicadas en dichas explotaciones, que podrían actuar como factores de riesgo asociados con mayores niveles de seroprevalencia de PE (Artículo 1).
2. Evaluar posibles factores de riesgo, relacionados tanto con el propio animal como con la explotación donde se aloja, que

- puedan influir en un mayor número de caballos seropositivos a PE (*T. equi*/*B. caballi*) en todo el territorio nacional (Artículo 2).
3. Comparar las diferentes pruebas disponibles de diagnóstico de piroplasmosis equina en caballos con sintomatología compatible, poniendo a punto un protocolo de diagnóstico molecular para la detección específica y simultánea de *T. equi* y *B. caballi*, y presentando así la técnica más apropiada para lograr un correcto diagnóstico de PE en estos casos (Artículo 3).
 4. Estimar las pérdidas económicas que la PE ocasiona en el sector ecuestre español, concretamente en el comercio exterior de caballos vivos (Artículo 4).
 5. Identificar una posible asociación entre los factores extrínsecos e intrínsecos propios del caballo y los genotipos de *T. equi* y *B. caballi* identificados (Artículo 5).

3. PLAN DE TRABAJO / METODOLOGÍA

3.1 Área/población de estudio y tamaño de la muestra

Para llevar a cabo el presente trabajo de investigación se realizaron muestreos en distintas explotaciones equinas y se emplearon muestras recibidas en el centro VISAVET para su análisis por el Servicio de Vigilancia Sanitaria Equina (SEVISEQ).

El estudio piloto (artículo 1) se llevó a cabo con muestras de suero equino utilizadas en dos estudios previos (Cruz et al., 2015; Cruz et al., 2016b). Estas muestras se recogieron en base a la población de caballos P.R.E registrada en varias provincias de la zona centro de España (Madrid, Segovia, Ávila, Cuenca, Guadalajara y Toledo) por el Sistema Nacional ARCA a fecha de diciembre de 2012 (MAGRAMA, 2012): 21.309 caballos P.R.E (53% hembras y 47% machos) residentes en 2.174 yegudas. El número mínimo de caballos P.R.E a muestrear se calculó mediante el programa estadístico WinEpi utilizando la fórmula para una población finita (De Blas, 2006):

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot q \cdot N}{e^2 (N-1) + Z^2 \cdot p \cdot q}$$

Además, se consideró una seroprevalencia esperada del 50% tanto para *T. equi* como para *B. caballi*, un nivel de confianza del 95% y un 5% de precisión; resultando en un mínimo de 378 caballos a analizar.

La población de caballos fue estratificada por explotaciones equinas de cría, las cuales se eligieron siguiendo los métodos propuestos por Dohoo et al. (2003b) en función del número de caballos y la densidad de población de las mismas, su distribución en el centro de España y el clima del área de ubicación según la clasificación climática de Köppen-Geiger (Rubel and Kottek, 2010). En cada yeguada se muestrearon todos los machos y al menos el 25% de las hembras y potros mayores de 8 meses presentes en la misma.

Por otro lado, en el estudio nacional (artículo 2) se realizó un muestreo aleatorio estratificado por CCAA en función del censo de caballos existente en España en el año 2013. Este censo fue obtenido a partir de un estudio relativo al impacto del sector ecuestre en nuestro país (Deloitte, 2013). Para el cálculo del número mínimo de caballos a muestrear también se utilizó el programa WinEpi y la fórmula para una población finita descrita anteriormente (De Blas, 2006). Se consideró una seroprevalencia esperada para *T. equi* del 21.9% (Camino et al., 2016), un nivel de confianza del 95% y una precisión del 3%, estimándose finalmente un mínimo de 730 caballos a analizar. Los veterinarios clínicos que participaron en este estudio recogieron muestras de 10 caballos (50% machos y 50% hembras aproximadamente) mayores de 8 meses de edad, de al menos dos explotaciones diferentes, y las enviaron al Servicio SEVISEQ para su análisis.

Los estudios complementarios 1 (artículo 3) y 2 (artículo 4) se llevaron a cabo con muestras recibidas en el centro VISAVET para su análisis por el Servicio SEVISEQ. Las muestras del artículo 3 procedían de 140 caballos que mostraban signos clínicos compatibles con PE, en las cuales el veterinario clínico emisor quería confirmar o descartar dicha enfermedad. El artículo 4 se realizó con muestras de 3.368 caballos aparentemente sanos residentes en 15 de las 17 CCAA de España, las cuales fueron enviadas para el análisis previo a la exportación.

Por último, el estudio complementario 3 (artículo 5) se desarrolló con un subgrupo de 100 muestras procedentes del estudio nacional. Estas muestras se seleccionaron para su estudio filogenético debido a que mostraron una elevada carga parasitaria ($Cq < 35$) al ser analizadas mediante PCR a tiempo real en el estudio nacional.

De cada uno de los caballos incluidos en estos estudios se recogieron 10 ml de sangre en un tubo sin anticoagulante y/o 10 ml de sangre en un tubo con EDTA como anticoagulante mediante punción venosa. Los tubos fueron identificados con el nombre o número de microchip del caballo o en su defecto con el número UELN.

Los propietarios de los caballos recibieron una hoja informativa con los detalles de los estudios y firmaron un consentimiento informado para la recolección de las muestras de sangre y la adquisición de datos relativos a los caballos y/o a las medidas de prevención y control de enfermedades infecciosas equinas en las yeguas mediante la cumplimentación de cuestionarios. La firma de este consentimiento también permite la utilización de dichas muestras en estudios posteriores. Toda la información proporcionada fue tratada de forma confidencial en todo momento.

3.2 Análisis serológicos

Las muestras de sangre recogidas en tubos sin anticoagulante se centrifugaron a una velocidad de 2500 rpm durante 5 minutos a 4°C para la extracción del suero, posteriormente a la formación del coágulo. El suero se analizó con el fin de determinar la presencia de anticuerpos frente a *T. equi* y *B. caballi* mediante la técnica ELISA de competición y la técnica de fijación del complemento.

3.2.1 ELISA de competición (cELISA)

La presencia de anticuerpos IgG específicos frente a *T. equi* y *B. caballi* se determinó mediante la utilización de dos kits cELISA comerciales: *Theileria (Babesia) equi* Antibody Test Kit y *B. caballi* Antibody Test Kit (VMRD® Inc., Pullman, WA, USA), respectivamente. Dichos kits están basados en el uso de proteínas recombinantes antigénicas [EMA-1 (*T. equi*) y RAP-1 (*B. caballi*)] y de anticuerpos monoclonales específicos. La empresa VMRD desarrolló estos kits a partir de dos protocolos (uno específico para *T. equi* y otro para *B. caballi*) diseñados por los Laboratorios Nacionales de los Servicios Veterinarios del Departamento de Agricultura de EEUU (NVSL, APHIS, USDA), los cuales estaban basados en estudios llevados a cabo por Knowles et al. (1992), Kappmeyer et al. (1999) y Katz et al. (2000). La sensibilidad (S) y especificidad (E) de estos test se determinaron mediante la realización de pruebas paralelas que comparaban los

protocolos de NVSL con los kits VMRD, obteniéndose los valores siguientes: *T. equi*: S = 95.0%; E = 99.5%, *B. caballi*: S = 100%; E = 100%.

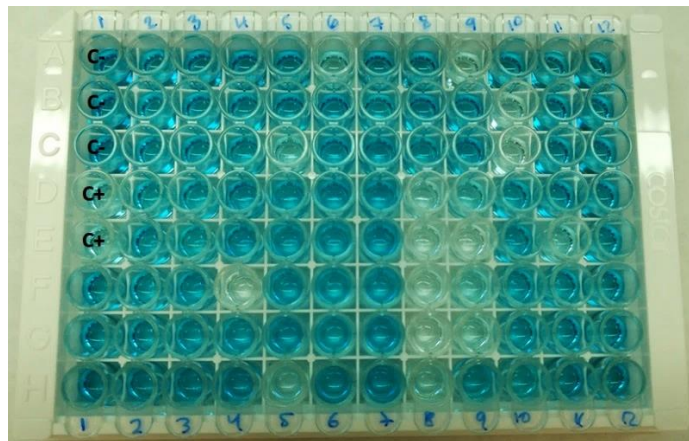
Cada uno de los dos kits incluye los siguientes componentes: 2 microplacas de 96 pocillos recubiertos con EMA-1 o RAP-1, control positivo (2 ml), control negativo (2 ml), anticuerpo monoclonal primario (0.3 ml), anticuerpo monoclonal secundario o conjugado (marcado con una enzima peroxidasa) (0.3 ml), buffer para la dilución de los sueros (10.5 ml), buffer para la dilución de los anticuerpos (60 ml), solución de lavado (120 ml), sustrato (30 ml) y solución de parada (30 ml). Estos componentes no son intercambiables entre ambos kits.

De acuerdo a las instrucciones fijadas por el fabricante, tanto los sueros problema como los reactivos deben alcanzar una temperatura ambiente ($21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) antes del inicio de la prueba. El procedimiento comienza con la dilución de los sueros y los controles (3 negativos y 2 positivos) en una microplaca desechable. Después, 50 μl de cada una de estas diluciones son transferidos a la placa cuyos pocillos están recubiertos con el antígeno recombinante, incubándose dicha placa 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se vacían los pocillos y se lavan 3 veces con aproximadamente 300 μl de solución de lavado previamente diluida. A continuación, se añade 50 μl de anticuerpo primario (ya diluido) y se realiza una segunda incubación y lavado. Se añaden 50 μl del conjugado (ya diluido), incubándose y lavándose la placa por tercera vez. Finalmente, se añaden 50 μl de sustrato, se incuba la placa durante 15 minutos en oscuridad e inmediatamente se añaden 50 μl de solución de parada y se leen las densidades ópticas (DO) de cada uno de los pocillos de la placa.

En este tipo de ELISA, el suero problema compite con el anticuerpo monoclonal primario por la unión al antígeno inmovilizado en los pocillos de la placa. La adición del sustrato da lugar a la aparición de un color azul, cuya intensidad dependerá de la presencia o

ausencia de inhibición de la unión del anticuerpo monoclonal primario con el antígeno recombinante (Figura 8). El color azul claro (suero positivo) se debe a la presencia de anticuerpos en el suero problema, siendo éstos responsables de la inhibición de la unión del anticuerpo monoclonal primario con el antígeno, y por consiguiente de la falta de actividad del resto de reactivos. El color azul oscuro (suero negativo) indica que se ha producido la unión del anticuerpo primario con el antígeno, lo cual es debido a la ausencia de anticuerpos en el suero problema. En este caso, dicha unión es marcada por la peroxidasa del conjugado y posteriormente detectada por el sustrato dando lugar a la aparición de un color más intenso.

Figura 8: Coloración de los pocillos tras la realización de los kits cELISA.



La lectura de las DO de los pocillos se realizó mediante un lector para placas ELISA (Anthos ZENYTH 3100) a una longitud de onda de 620 nm. Para que el test sea válido el valor medio de DO de los controles negativos debe situarse entre 0.300 y 2.000. Para cada muestra se debe calcular el porcentaje de inhibición (% I) por medio de la siguiente fórmula:

$$\% I = 100 [1 - (DO \text{ muestra} \div DO \text{ control negativo})]$$

Las muestras con un % I igual o superior al 40% son consideradas positivas y aquellas cuyo % I sea menor de 40% son negativas.

3.2.2 Fijación del complemento (FC)

La presencia de anticuerpos IgM específicos frente a *T. equi* y *B. caballi* se determinó mediante el uso de la FC. Dichos anticuerpos son principalmente producidos en infecciones primarias. El sistema del complemento es un conjunto de proteínas séricas que se activan con el reconocimiento de complejos antígeno – anticuerpo dando lugar a fenómenos tales como promoción de la inflamación local, facilitación de la fagocitosis y lisis celular. La técnica de FC está basada en la activación del complemento en presencia de dichos complejos, lo que produce el consumo del mismo. Aún sin la presencia de estos complejos, la activación del complemento puede ser estimulada por ciertas inmunoglobulinas presentes en el suero, fenómeno conocido como actividad anticomplementaria.

En este trabajo de investigación, la FC fue puesta a punto siguiendo las instrucciones descritas en la ficha de la PE del Manual de los Animales Terrestres de la OIE. Para ello se utilizaron antígenos y controles positivos específicos de *T. equi* y de *B. caballi* y un control negativo para ambos parásitos, todos ellos suministrados por los Laboratorios Nacionales de los Servicios Veterinarios del Departamento de Agricultura de EEUU (NVSL, APHIS, USDA).

Para la realización de dicha técnica son necesarios los siguientes elementos: microplaca desechable, tampón veronal, controles positivo y negativo, antígeno, complemento y sistema hemolítico. Los controles positivos y el antígeno deben ser los específicos para cada parásito. El tampón veronal es utilizado como diluyente para la realización de todas las diluciones necesarias. El complemento (suero de cobaya) se debe titular espectrofotométricamente antes de su uso para determinar la dosis que causa hemólisis al 50% de las células (CH_{50}) y se utiliza en la prueba a valores de 5 veces la CH_{50} . El sistema hemolítico es un sistema indicador que consta de partes iguales de una suspensión al 2% de eritrocitos de oveja sensibilizados y de

tampón veronal con 5 dosis hemolíticas mínimas de hemolisina (previamente titulada), la cual actúa como un anticuerpo antieritrocitario provocando la lisis de éstos.

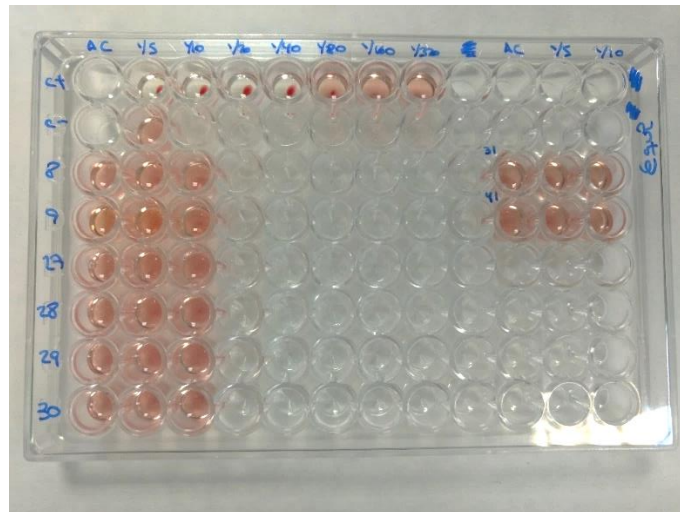
En primer lugar y con el fin de evitar la presencia de actividad anticomplementaria en los sueros problema, éstos se deben inactivar a 56°C durante 30 minutos. Durante este tiempo se lleva a cabo la preparación del sistema hemolítico. Para ello, se lava la sangre de oveja tres veces, la primera con solución salina al 0.9% y después con tampón veronal. El pellet resultante de los lavados y el tampón veronal se utilizan para la preparación de la solución de hematíes al 2%, la cual se mezcla con la misma cantidad de hemolisina, formando el sistema hemolítico, que se mantendrá en refrigeración hasta su uso.

Posteriormente, la FC se divide en dos etapas. En la primera etapa se realizan soluciones seriadas de los controles (uno positivo y otro negativo) y sueros problema en una microplaca desechable, manteniendo un volumen de 25 µl en cada pocillo. Este volumen se mezcla con la misma cantidad de antígeno y complemento (ya diluido). La placa se incuba a 37°C durante una hora. En la segunda etapa, se añaden 50 µl de sistema hemolítico, resultando en un volumen total de 125 µl por pocillo, y la placa se incuba de nuevo a 37°C durante 45 minutos. Finalmente, la placa se centrifuga a una velocidad de 300 g y una temperatura de 4°C durante 5 minutos. Para cada muestra se debe incluir un pocillo para detectar la presencia de actividad anticomplementaria. En este pocillo se añadirán todos los reactivos anteriores, excepto el antígeno, que será reemplazado por tampón veronal.

Si el suero problema contiene anticuerpos frente al antígeno de interés (suero positivo) aparecerá un punto rojo en el fondo del pocillo. Esto es debido a que la activación del complemento en presencia del complejo antígeno – anticuerpo evitará la unión de la hemolisina y por tanto la lisis de los glóbulos rojos dando lugar a una sedimentación de estos. Sin embargo, con la ausencia de

anticuerpos en el suero problema (suero negativo), no se producirá la activación del complemento, pero sí la activación de la hemolisina que lisará los glóbulos rojos dando lugar a la aparición de un color rojo en el pocillo. La Figura 9 muestra los distintos resultados de una FC.

Figura 9: Resultado final de la técnica FC.



*La columna marcada con AC detecta la presencia de actividad anticomplementaria.

Se considera como resultado positivo una lisis menor o igual al 50% y su título corresponderá a la dilución inmediatamente superior a la que produce dicha lisis.

3.3 Frotis sanguíneos

En las muestras de sangre recogidas en tubos de EDTA también se investigó la presencia de piroplasmas intraeritrocitarios mediante la realización, tinción y visualización de frotis sanguíneos.

Como paso previo a la realización del frotis y para asegurar una correcta distribución de las células sanguíneas en el mismo es necesario homogeneizar la sangre cuidadosamente de 3 a 5 veces. Posteriormente, se deposita una gota de sangre (10 µl aproximadamente) sobre uno de los extremos de un portaobjetos de vidrio y se coloca un cubreobjetos a unos pocos milímetros por delante de la sangre en un ángulo de 30-45°. Dicho cubreobjetos se hace retroceder hasta tocar la gota y seguidamente se desliza por todo el portaobjetos de forma continua e ininterrumpida hasta el extremo opuesto para crear el frotis o extensión sanguínea.

El ángulo entre el cubre y el portaobjetos va a determinar el largo del frotis, así la disminución del ángulo va a producir frotis más largos; mientras que un mayor ángulo dará como resultado frotis más pequeños. El frotis ideal debería ocupar tres cuartas partes del portaobjetos y se deberían distinguir 3 zonas claramente diferenciadas: el cuerpo o zona inicial de la extensión, la monocapa o zona intermedia y la cola o zona final.

Se realizaron dos extensiones de cada muestra de sangre, con el fin de seleccionar para su tinción aquella en cuya zona intermedia la mayoría de las células se disponían en forma de monocapa. Antes de proceder con la tinción, los frotis se dejaron secar al aire. La tinción utilizada fue la de tipo Diff-Quick, tinción rápida de tipo Romanovsky basada en una modificación de la tinción de Wright Giemsa, que permite reducir el tiempo de procesamiento con respecto a esta última de 4 minutos a solo 15 segundos. Esta tinción se compone de 3 soluciones, en las cuales los frotis se sumergieron unas 5 veces (segundos) en el siguiente orden: solución fijadora (metanol), solución roja (eosina) y solución azul (azul de metileno). Finalmente, los frotis se lavaron con agua corriente y se dejaron secar al aire. Con estas soluciones los GR se tiñen de color rosa, y en el caso de los GB: el núcleo de color violeta, el citoplasma de color azul grisáceo, y las granulaciones de color anaranjado (eosinófilos) o violeta (basófilos).

La visualización de los piroplasmas intraeritrocitarios se llevó a cabo utilizando el objetivo de 40x y el de 100x (inmersión) de un microscopio óptico.

3.4 Análisis hematológicos

Las muestras de sangre recogidas en los tubos con EDTA se utilizaron para determinar el estatus sanitario de caballos sospechosos de padecer PE. Para ello se evaluaron cinco parámetros hematológicos [glóbulos rojos (GR), hemoglobina (Hgb), hematocrito (Htc), glóbulos blancos (GB) y plaquetas] empleando un analizador automatizado de hematología (Urit 2900 Vet Plus TS, URIT Medical Electronic Group Co, LTD, Guilin, China) (Figura 10). Los intervalos de referencia (Tabla 7) utilizados en la evaluación de estos parámetros se calcularon en un estudio realizado en nuestro laboratorio, en el cual se analizaron 120 caballos clínicamente sanos empleando el mismo analizador automático de hematología (datos no publicados).

Figura 10. Analizador automático de hematología.



Tabla 7. Intervalos de referencia utilizados en la evaluación de los parámetros hematológicos.

Parámetro	Unidad de medida	Intervalo de referencia
Glóbulos rojos	$\times 10^6/\mu\text{l}$	5.3-13.0
Hemoglobina	g/dl	10.8-18.8
Hematocrito	%	30.0-53.0
Glóbulos blancos	$\times 10^3/\text{mm}^3$	5.0-11.0
Plaquetas	$\times 10^3/\text{mm}^3$	96-360

Este analizador es un sistema contador automático compuesto por un sector de aspiración, un sector de dilución, un sector de medida y una pantalla táctil que puede mostrar al mismo tiempo 21 parámetros y 3 histogramas; también dispone de conexión a la red para la transmisión de los resultados generados. Los histogramas aportan información sobre los valores de GR, GB y plaquetas resultantes. Los niveles de estos tres parámetros se miden en base a la impedancia eléctrica. Sin embargo, para la determinación de la concentración de Hgb se utiliza un principio fotoeléctrico, la colorimetría.

3.5 Análisis bioquímicos

El suero obtenido de la centrifugación de las muestras de sangre recogidas en tubos sin anticoagulante también fue empleado para determinar el valor de dos parámetros bioquímicos [BT y bilirrubina directa (BD)], utilizando un analizador automático de bioquímica (TECOM TC220, TECOM, Jiangxi, China) (Figura 11), dos reactivos de química líquida (DILABO, Ciudad Real, España) y los intervalos de referencia (Tabla 8) proporcionados por un estudio realizado en nuestro laboratorio, en el cual se analizaron 120 caballos clínicamente sanos empleando el mismo analizador automático de bioquímica y los mismos reactivos (datos no publicados).

Figura 11. Analizador automático de bioquímica.



Tabla 8. Intervalos de referencia utilizados en la evaluación de los parámetros bioquímicos.

Parámetro	Unidad de medida	Intervalo de referencia
Bilirrubina directa	mg/dl	0.01-0.67
Bilirrubina total	mg/dl	0.1-2.5

El analizador automático utilizado es un espectrofotómetro que consta de 26 posiciones refrigeradas para el alojamiento de los reactivos, 60 cubetas de reacción reutilizables y 18 posiciones para las muestras. Las cubetas de reacción disponen de una longitud óptica de 6 mm y un volumen de reacción de 150-400 µl, existiendo una prueba de blanco automática para cada una de ellas. En cada cubeta tiene lugar la reacción entre la muestra y un determinado reactivo a una temperatura de $37 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ y con una duración de 8 a 12 minutos. Dicha reacción es medida mediante un sistema de fotocolorimetría utilizando una fuente de luz (lámpara halógena de tungsteno), a una longitud de onda de 300-800 nm y con una precisión de ± 2 nm.

3.6 Análisis moleculares

3.6.1 PCR a tiempo real de tipo *multiplex*

Las muestras de EDTA también se utilizaron para la detección de material genético de forma simultánea y específica de *T. equi* y *B. caballi* en las mismas. Para ello, el ADN genómico de cada una de las muestras fue extraído usando el kit comercial QIAamp DNA mini kit (Qiagen®, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Esta PCR fue adaptada de los ensayos de PCR a tiempo real previamente publicados para la amplificación de una porción de la región V4 hipervariable de la subunidad pequeña del gen 18S rRNA de *T. equi* (Kim et al., 2008) y *B. caballi* (Bhoora et al., 2010b). Los cebadores y sondas utilizados fueron específicos para cada protozoo (Tabla 9).

Tabla 9. Secuencias de los cebadores y sondas empleados para amplificar el gen18S rRNA de *Theileria equi* y *Babesia caballi*.

Piroplasma		Tamaño (pb)	Secuencia 5'-3'	Fluoróforo 5'-3'
<i>Theileria equi</i>				
Cebador	Be18S F	21	GCG GTG TTT CGG TGA TTC ATA	-
	Be18S R	29	TGA TAG GTC AGA AAC TTG AAT GAT ACA TC	
Sonda	Be18SP	22	AAA TTA GCG AAT CGC ATG GCT T	FAM-BHQ1
<i>Babesia caballi</i>				
Cebador	Bc_18SF402	24	GTA ATT GGA ATG ATG GCG ACT TAA	-
	Bc_18SR496	22	CGC TAT TGG AGC TGG AAT TAC C	
Sonda	Bc_18SP	14	CCT CGC CAG AGT AA	RED-BHQ2

La reacción de PCR tuvo lugar en un volumen final de 25 µl con los siguientes reactivos: 5x TaqMan QuantiFast master mix, 0.4 µM de cada cebador, 0.2 µM de la sonda de *T. equi*, 0.4 µM de la sonda de *B. caballi* y 5 µl de ADN extraído. Para optimizar el ensayo se probaron cuatro temperaturas de hibridación distintas (55, 56, 58 y 60°C). Las condiciones de amplificación finales correspondieron a un ciclo de

95°C durante 5 minutos (desnaturalización inicial), seguido de 45 ciclos de 95°C durante 1 segundo (desnaturalización) y 55°C durante 60 segundos (hibridación y extensión).

La eficiencia (*T. equi*: 96.5%; *B. caballi*: 100.7%) y la linealidad (*T. equi*: R^2 0.983; *B. caballi*: R^2 0.981) de la PCR fueron elevadas, así como la sensibilidad [del 100% a Cq 37.7 (*T. equi*) y a Cq 38.9 (*B. caballi*)], con un límite de detección al 95% de probabilidad de 3.0×10^{-4} % de eritrocitos parasitados para *T. equi* y de 2.0×10^{-3} % para *B. caballi*. La especificidad se evaluó usando muestras positivas a *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* sin mostrar ninguna de éstas señales de fluorescencia en la reacción.

3.6.2 PCR anidada

Este tipo de PCR fue utilizado en el artículo 5 como primer paso para la realización de estudios filogenéticos de *T. equi* y *B. caballi* en aquellas muestras que presentaron una elevada carga parasitaria (Cq < 35) en la PCR a tiempo real realizada con anterioridad en el artículo 2. Esta PCR anidada había sido diseñada para la detección de cualquier especie de los géneros *Theileria*/*Babesia* con el fin de amplificar un fragmento génico de 390 pb (*Babesia*) o de 410 pb (*Theileria*) que codifica para una porción de la región V4 hipervariable de la subunidad pequeña del gen 18S rRNA utilizando los cebadores externos BT1-F (5' GGT TGA TCC TGC CAG TAGT 3') y BTH-1R (5' TTG CGA CCA TAC TCC CCC CA 3') (Criado-Fornelio et al., 2003a), y los internos RLB-F2 (5' GAC ACA GGG AGG TAG TGA CAA G 3') y RLB-R2 (5' CTA AGA ATT TCA CCT CTG ACA GT 3') (Oura et al., 2004). La reacción de PCR tuvo lugar en un volumen final de 20 µl con los siguientes reactivos: GeneAmp 10x Buffer (Applied Biosystems®), 0.2 mM dNTP solution mix (New England Biolabs®), 0.5 µM de cada cebador, 0.025 unidades/µl DNA polimerasa [GoTaq DNA Polymerase (Promega®)] y 2 µl de ADN.

Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Coultous et al. (2019b): activación de la polimerasa a 94°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, alineación a 67°C (cebadores externos) o 57°C (cebadores internos) durante 60 segundos y elongación a 72°C durante 1 minuto, y una extensión final a 72°C durante 5 minutos. El producto de la primera reacción fue diluido 1:10 para iniciar la segunda reacción. Tras la segunda reacción se visualizaron 6 µl de producto de PCR en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1x y 5 µl de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml) (Sigma®).

La electroforesis se efectuó en tampón TAE 1x a 90V y 400Ma durante 20 minutos utilizando como marcador molecular el 100bp DNA ladder (New England Biolabs®). Finalmente, el gel se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Alpha Innotech FluorChem™ 5500) permitiendo la detección de bandas (correspondientes a productos amplificados) del tamaño molecular esperado y la ausencia de bandas inespecíficas.

Los productos de PCR resultantes fueron purificados con el kit de purificación QIAquick PCR Purification kit (Qiagen®, Reino Unido) para eliminar los restos de nucleótidos, cebadores, dNTPs y enzimas que suelen producir ruido de fondo impidiendo su secuenciación de forma directa. Posteriormente dichos productos se enviaron a *Eurofins Genomics* (Alemania) para su secuenciación por el método de Sanger.

3.7 Análisis filogenéticos

La identificación de las especies de piroplasmas correspondientes a las secuencias problema procedentes de la secuenciación de los productos de la PCR anidada se realizó mediante el programa informático de alineamiento de secuencias (BLAST), el cual es un programa gratuito de dominio público que puede usarse desde el servidor del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (NCBI, 2020). Este programa compara secuencias problema con otras previamente caracterizadas y almacenadas en la base de datos del NCBI, mostrando aquellas que tienen un mayor porcentaje de identidad con las mismas.

Una vez BLAST identificó las secuencias problema como *T. equi* y *B. caballi*, varias secuencias procedentes del GenBank, representativas de los genotipos ya descritos de ambos piroplasmas y con una homología superior al 95% con nuestras secuencias, se descargaron para llevar a cabo alineamientos. Todas las secuencias se alinearon y compararon mediante el método MUSCLE (Edgar, 2004) utilizando el programa AliView (Larsson, 2014), el cual permite la visualización y la edición de los alineamientos resultantes. Finalmente, se construyeron dos árboles filogenéticos (uno específico para cada piroplasma) con el objetivo de definir la diversidad genética de estos parásitos existente en todo el territorio nacional. Para ello, los análisis estadísticos de evolución molecular se realizaron en base al método de estimación por máxima verosimilitud (*maximum likelihood*) y utilizando el programa informático MEGA versión 7.0.26 (Kumar et al., 2016).

3.8 Análisis estadísticos

En función del diseño y la población de estudio de los artículos que componen esta tesis doctoral se estimaron dos tipos de (sero)prevalencia: aparente y real. El cálculo de la (sero)prevalencia aparente se llevó a cabo considerando el porcentaje de resultados positivos obtenidos en el cELISA o PCR a tiempo real del número total de caballos muestreados. El cálculo de la (sero)prevalencia real se realizó utilizando el programa estadístico WinEpi en base a la población de équidos registrada en España en el año 2012 (MAGRAMA, 2012) y 2013 (Deloitte, 2013), un nivel de confianza del 95%, y a la sensibilidad y especificidad de los test diagnósticos empleados (cELISA, FC y PCR).

Por medio de los programas estadísticos STATA® versión 12.0 (StataCorp®, Texas, USA) y SPSS® versión 20.0 (IBM®, Nueva York, USA) se llevaron a cabo diferentes pruebas estadísticas con el objetivo de analizar los resultados derivados de los distintos test diagnósticos utilizados en los estudios. La prueba chi-cuadrado (X^2) se empleó para determinar la existencia o no de independencia entre dos variables nominales o cualitativas; el coeficiente kappa de Cohen (k) para estimar el nivel de acuerdo entre dos pruebas diagnósticas; la prueba de Kolmogórov-Smirnov para verificar la normalidad de una distribución; y el coeficiente de correlación de Pearson (r) y el de Spearman (p) para valorar la asociación entre dos variables cuantitativas que siguen una distribución normal (paramétrica) o no normal (no paramétrica), respectivamente. Además, otras pruebas como la t de Student (U de Mann-Whitney para variables no paramétricas) y el análisis de la varianza (ANOVA) (Kruskal-Wallis para variables no paramétricas) se utilizaron para la comparación de medias o medianas entre variables bicategorías o entre aquellas que presentan más de 2 categorías, respectivamente.

Por otro lado, los resultados de seropositividad de las pruebas cELISA también se emplearon para la construcción de modelos de regresión logística utilizando el programa STATA® nombrado anteriormente. Estos modelos incluyeron distintos factores de riesgo, relativos tanto al propio animal como a la explotación de alojamiento, que resultaron estar

asociados con mayores niveles de seroprevalencia de *T. equi* y *B. caballi*. Para ello, los veterinarios clínicos equinos que colaboraron en los estudios completaron un cuestionario con las principales características de los caballos muestreados y de la explotación de alojamiento de los mismos. Todos los datos (variables) de los cuestionarios se consideraron posibles factores de riesgo, evaluándose la linealidad de las variables continuas en función del resultado de la técnica cELISA; aquellas variables sin evidencia de linealidad se organizaron en categorías. Todas las variables fueron analizadas de forma univariable y aquellas que mostraron un valor de p menor o igual a 0.25 fueron incluidas en un modelo multivariable inicial, en el cual también se incluyeron diversos factores o variables de confusión con el fin de detectar una correlación falsa en la asociación entre la variable independiente y la variable dependiente. El fenómeno de confusión aparece cuando la relación observada entre ambas variables puede ser total o parcialmente explicada por otra variable (factor de confusión) o, por el contrario, cuando dicha relación queda enmascarada por este factor. La variable de confusión también se conoce como tercera variable o variable mediadora y debe ser un factor pronóstico del resultado y estar asociado a la exposición. Estas variables son responsables del análisis incorrecto de los resultados, sobreestimando o subestimando el efecto de los factores de riesgo sobre la enfermedad y produciendo un rechazo incorrecto de la hipótesis nula (Dohoo et al., 2003a).

El modelo multivariable final se construyó utilizando un procedimiento de eliminación de variables paso a paso, en el cual las variables retenidas fueron aquellas con un valor de p menor a 0.05 o cuya eliminación resultó en un cambio significativo en el efecto de otras variables indicando confusión. Posteriormente, se comprobó la existencia de interacciones entre las variables de confusión y aquellas retenidas en el modelo, incluyéndose en dicho modelo las interacciones que resultaron significativas. En caso de disponer de varios modelos multivariable válidos, éstos se compararon entre sí utilizando el Criterio de información de Akaike (AIC) y el Criterio de información bayesiano (BIC). Finalmente, en el modelo seleccionado (donde los efectos aleatorios están excluidos) se realizó la prueba de

bondad de ajuste de Hosmer-Lemeshow y se calculó el área bajo la curva para evaluar la adaptación y el poder predictivo general del modelo propuesto, respectivamente.

4. RESULTADOS

4.1 Estudio piloto

4.1.1 Artículo 1: Situación epidemiológica de la exposición a los agentes causantes de la piroplasmosis equina en caballos de Pura Raza Española en España: seroprevalencia y factores de riesgo asociados

Referencia publicación: Camino, E., de la Cruz, M.L., Dominguez, L., Carvajal, K.A., Fores, P., de Juan, L., 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*. *J Equine Vet Sci* 67, 81-86.

Este artículo fue publicado en el año 2018 en la revista "*Journal of Equine Veterinary Science*" [factor de impacto: 0.927, cuartil: Q3, ranking: 76/141 (*Veterinary Sciences*)].

Resumen:

La piroplasmosis equina es una enfermedad transmitida por garrapatas ixódidas y causada por dos protozoos intraeritrocitarios: *B. caballi* y *T. equi*. Tras la recuperación de la infección aguda, los caballos pueden permanecer como portadores de estos parásitos durante un largo periodo de tiempo (*B. caballi*) o de forma permanente (*T. equi*), siendo fuente de infección para otros caballos. Esta enfermedad es endémica en la mayoría de los países con climas tropicales, subtropicales y templados (incluida España). América del Norte, Japón, Nueva Zelanda y Australia son países libres de PE, estatus que intentan mantener permitiendo solo la entrada de caballos seronegativos. Este requisito hace que un gran número de caballos (principalmente P.R.E) no puedan ser exportados a dichos países, provocando así grandes pérdidas económicas para la industria equina española.

Hasta la fecha se disponen de pocos estudios relativos a la seroprevalencia y a los factores de riesgos asociados con la PE en España, no existiendo datos sobre la exposición a esta enfermedad en los caballos P.R.E. El objetivo de este estudio fue determinar la seroprevalencia de PE en la población de

caballos P.R.E registrada en el centro de España (área con un alto riesgo de enfermedades infecciosas equinas debido a que supone un punto de parada para muchas exportaciones) e identificar factores potenciales de riesgo asociados con mayores niveles de seropositividad de esta enfermedad. Para ello, y de acuerdo con el número de caballos y de explotaciones equinas de cría censados por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) a fecha de diciembre de 2012, la sangre de 536 caballos localizados en 35 explotaciones fue analizada utilizando dos kits comerciales cELISA. Para la identificación de los factores de riesgo se llevaron a cabo dos modelos independientes de regresión logística, utilizando los datos recogidos en cuestionarios orientados a conocer las principales características de cada una de las explotaciones y las medidas de prevención y control de enfermedades infecciosas equinas aplicadas en las mismas.

La existencia de exposición a PE se detectó en al menos un caballo en 27 de las 35 explotaciones (81.1%; 95% IC 68.2-94.0), estando *T. equi* y *B. caballi* presente en un 78.1% (95% IC 64.5-91.7) y en un 35.7% (95% IC 20.0-51.5) de las mismas, respectivamente. Un total de 129 caballos (24.9%; 95% IC 21.3-28.6) mostraron anticuerpos contra PE, siendo el 22.6% (95% IC 19.1-26.1) positivos a *T. equi* y el 4.6% (95% IC 2.8-6.3) positivos a *B. caballi*. La seroprevalencia de PE en machos (26.7%; 95% IC 21.1-32.4) fue mayor que en yeguas (23.6%; 95% IC 18.9-28.3), sin observarse una diferencia estadísticamente significativa. El aumento de la edad de los caballos y la presencia de un mayor número de machos en las explotaciones se identificaron como factores de riesgo asociados con una mayor seropositividad a PE. También se encontró un mayor número de caballos seropositivos a *B. caballi* en aquellas explotaciones con una densidad de población mayor de 2.500 caballos/km². Por otro lado, la aplicación de un programa de vacunación y de medidas de desinfección en las explotaciones se identificaron como factores preventivos frente a *T. equi* y *B. caballi*, respectivamente. Además, se encontró una posible asociación entre una menor seroprevalencia de *B. caballi* y la separación de yeguas

preñadas y caballos jóvenes de 1 a 2 años de edad; hecho que no había sido sugerido previamente por otros estudios.

Este estudio revela una elevada presencia de PE en las explotaciones equinas del centro de España, junto con una moderada exposición de los caballos P.R.E a ambos parásitos. Los factores de riesgo identificados deberían tenerse en cuenta a la hora de implementar medidas de control eficaces para la prevención de enfermedades infecciosas equinas en las explotaciones.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Equine Veterinary Science

journal homepage: www.j-evs.com

Original Research

Epidemiological Situation of the Exposure to Agents Causing Equine Piroplasmosis in Spanish Purebred Horses in Spain: Seroprevalence and Associated Risk Factors

Eliazar Camino^a, Maria Luisa de la Cruz^a, Lucas Dominguez^a, Kelly Alejandra Carvajal^a, Paloma Fores^b, Lucia de Juan^a, Fatima Cruz-Lopez^{a,*}^a VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense, Madrid, Spain^b Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 January 2018

Received in revised form

12 March 2018

Accepted 12 March 2018

Available online 16 March 2018

Keywords:

*Theileria equi**Babesia caballi*

Spain

Seroprevalence

Risk factor

ABSTRACT

Equine piroplasmosis (EP) is a tick-borne disease caused by *Babesia caballi* and *Theileria equi*, which causes severe economic losses to the equine industry, represented by the Spanish Purebred (SP) horse in Spain. The seroprevalence of EP is known in certain regions of Spain, but till date, there are no data in SP horses. The aim of this study was to determine the seroprevalence of EP in the SP breeding horse population in central Spain and to evaluate risk factors associated with the occurrence of the infection. A total of 536 horse serum samples were tested for antibodies against *T. equi* and *B. caballi* by competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. Data on possible risk factors were examined using two logistic regression models with and without a random effect at the stud farm level. The true seroprevalence results were 21.8% for *T. equi* and 4.7% for *B. caballi*. Increasing horse age and increasing numbers of breeding stallions on the stud farm were identified as factors associated with EP seropositivity. The implementation of vaccination programs in the horses and disinfection measures in the premises were associated with a lower *T. equi* and *B. caballi* seroprevalence, respectively. A moderate exposure to EP was found in SP horses in central Spain. Further investigations are necessary to ensure appropriate preventive measures for stud farms and to facilitate the development of an EP surveillance program in the SP breeding horse population.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Equine piroplasmosis (EP) is a disease of equids caused by the intraerythrocytic protozoan parasites, *Theileria equi* and *Babesia caballi* [1]. The clinical signs of EP are variable and usually nonspecific [2,3]; ranging from fever, depression, anemia, icterus,

edema, thrombocytopenia, hemoglobinuria, and mucosal petechiae to poor performance [4]. *T. equi* and *B. caballi* are mainly transmitted by ixodid ticks [5]. Horses can remain carriers for a long time after the resolution of clinical signs, even permanently in the case of horses parasitized by *T. equi* [6]. The disease is endemic in most tropical and subtropical regions of the world whereas North America, Japan, New Zealand, and Australia are considered free from EP [7,8].

Previous studies of EP seroprevalence have been carried out in Spain, including a cross-sectional study in horses, mules, and donkeys in Andalusia [9], a study in the north-west and in the central and south-western regions of Spain [10,11] and a recent study in samples before exportation collected throughout Spain [12].

The risk factors associated with the presence of antibodies against EP in horses have been investigated in several countries: India [13], Portugal [14], Italy [15], Greece [16], Turkey [17], Brazil [18], and Spain [9], showing that farm activity, increasing horse age,

Animal welfare/ethical statement: The whole sampling related to this study underwent the Ethical Committee of the Universidad Complutense de Madrid. The owners of the horses included in the study received an information sheet with all the information regarding the study, and they signed an informed consent that would allow the samples to be used in further studies.

Conflict of interest statement: The authors declare no conflict of interest in the subject, matter or materials discussed in this manuscript.

* Corresponding author at: Fatima Cruz-Lopez, VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

E-mail address: fatimacr@ucm.es (F. Cruz-Lopez).

<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.03.012>

0737-0806/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

presence of ticks, and access to pasture were the main risk factors for EP.

A large number of horses in Spain (mainly Spanish Purebred [SP]) are exported to countries free from EP, involving high economic losses for the Spanish equine industry due to the impossibility for these horses to be sold abroad [19]. Here, we conducted a study to estimate the seroprevalence of EP in the SP breeding horse population in central Spain and to identify potential horse and stud farm risk factors associated with seropositivity for EP. Our results may help to have a greater knowledge of the epidemiological situation of exposure to EP in the SP breed in Spain.

2. Materials and Methods

2.1. Study Area and Sample Collection

The number of horses sampled in the present study is a subset of the 555 horses used in two serological studies published previously [20,21]; 19 horses had to be discarded due to lack of serum to carry out the analysis. The horses studied resided in the central region of Spain, an area with a population of 21,309 SP horses (53% mares and 47% stallions) and a density of 0.39 SP horses/km² (similar to that in the whole of Spain) [22]. Furthermore, this central area has a variety of climate types representative of the whole country [23]. The population of SP sampled horses was stratified by stud farms, which were chosen based on their number of horses and population density, geographical distribution, and local climate type (following the Köppen-Geiger Climate Classification) [23]. The minimum sample size (378 horses) was calculated using the formula for a finite population [24], on the basis of a reference population of 21,309 SP horses in central Spain residing in 2,174 stud farms as of December 2012 [22] and an expected *T. equi* and *B. caballi* seroprevalence of 50% in this area, with 95% confidence and 5% precision.

The sample collection has already been described in previous studies [20,21]. At each stud farm, 10 mL of whole blood without anticoagulant was collected in every SP stallion and in at least 25% of all breeding SP mares residing in the stud farm and, when possible, a sample was also drawn in at least 25% of the colts and fillies of ≥ 8 months of age. The horses were selected by purposive sampling on the basis of their temperament and ease of handling and were considered healthy by a veterinary surgeon on the day of sampling. A veterinarian (with the help of the farm owner, when/if needed) completed a questionnaire, which aimed to gather information regarding the main characteristics and measures for the prevention and control of equine infectious diseases in the stud farm [21,25].

2.2. Serological Tests

The presence of IgG-specific antibodies against *T. equi* and *B. caballi* parasites in the serum samples of the study was determined by using two commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits, according to manufacturer's instructions: *Babesia equi* and *B. caballi* Antibody Test Kits (VMRD Inc., Pullman, WA), with a sensitivity of 95.0% and 100% and a specificity of 99.5% and 100%, respectively.

2.3. Statistical Analyses

To evaluate the strength and direction of the associations of the horse and stud farm risk factors with the seropositivity to *T. equi* and *B. caballi* based on the cELISA test, two independent models were performed: a multivariable mixed logistic regression model for *T. equi* with a random effect at the stud farm level to account for

clustering (or nonindependence) of horses residing in the same farm and a multivariable logistic regression model for *B. caballi*. Odds ratios (ORs) with their corresponding 95% confidence intervals (CIs) were used to measure the associations. All analyses were performed with the software Small STATA, version 12.0.

Risk factors considered were included as individual variables. All variables showing a *P* value $< .10$ in the univariable screening analysis of variables controlling for important confounders (sex, age, stud farm location and its climate) were selected for inclusion in a multivariable model, which included those confounders. The multivariable model was built using a manual stepwise backward variable selection procedure in which variables with a *P* $< .05$ were retained in the model or where their removal resulted in a significant change in the effect of other variables indicating confounding. Collinearity between variables was checked and excluded. To improve the goodness of fit, biologically plausible first-order interactions were determined between significant and confounders variables. The possible multivariable significant models were compared with each other by the Akaike information criterion and the Bayesian information criterion [26].

Resampling through bias-corrected bootstrap estimates (1,000 iterations) was performed to support inferences of the mixed logistic regression model [27]. For the logistic regression model excluding random effects, the Hosmer–Lemeshow goodness-of-fit test [28] was used to evaluate the fitting of the proposed model, and the area under the receiver operating characteristic curve was also calculated.

Finally, the existence of possible differences between the inhibition percentages obtained in the sampled population by cELISA for *T. equi* and *B. caballi* was evaluated with the Mann–Whitney *U* test.

3. Results

3.1. Sampled Population Demographics

The serum samples used for the present study were obtained between September 2011 and November 2013 from 536 SP horses residing on 35 different stud farms in the central region of Spain. Density of population in the 35 studied farms varied from 0.7 to 1,100 horses/km² (mean 117 horses/km² $\pm$ SD 222.1), and the size of stud farms ranged from 0.004 to 13 km² (mean 0.23 km² $\pm$ SD 2.5).

Sampled horses included 57.3% (307/536) mares and 42.7% (229/536) stallions. Mean horse age in the sample population was 6.4 years $\pm$ SD 4.8.

3.2. True Seroprevalence Results

Exposure to EP was detected in at least one horse in 27 out of 35 stud farms (81.1%; 95% CI 68.2–94.0). Stud farms with at least one seropositive horse for *T. equi* accounted for 78.1% (95% CI 64.5–91.7), and those with at least one seropositive horse for *B. caballi* represented the 35.7% (95% CI 20.0–51.5). There was a presence of both *T. equi* and *B. caballi* in only 7 out of 35 stud farms (20.6%; 95% CI 7.3–33.9).

Out of the 536 serum samples tested, a total of 129 horses (24.9%; 95% CI 21.3–28.6) showed antibodies against EP; 117 (22.6%; 95% CI 19.1–26.1) were seropositive for *T. equi*, and 25 (4.6%; 95% CI 2.8–6.3) were seropositive for *B. caballi*. A small percentage of horses (2.0%; 95% CI 0.9–3.2) were positive for both *T. equi* and *B. caballi*.

T. equi seroprevalence was 24.9% (95% CI 19.3–30.4) in stallions and 20.8% (95% CI 16.4–25.3) in mares, whereas *B. caballi* seroprevalence was 4.3% (95% CI 1.7–6.9) in stallions and 4.8% (95% CI 2.4–7.1) in mares. Because the reference horse population in

central Spain accounted for a 47% of stallions and a 53% of mares [22], the observed proportion of *T. equi* or *B. caballi* seropositive horses was adjusted for sex and clustering at the stud farm level, using a 95% confidence level. However, no differences were observed in the seroprevalence values after this adjustment. Table 1 summarizes the true seroprevalence results of the study, which accounted for the sensibility and specificity of both cELISA kits.

To check differences in the homogeneity of the inhibition percentages of both ELISAs with the hypothesis that antibodies against *T. equi* remain stable for a longer time after contact with the parasite, beginning to decrease at 24 months after treatment while antibodies against *B. caballi* begin to decrease at 3–15 months after treatment [29,30], the inhibition percentage results of both cELISAs (*T. equi* and *B. caballi*) were compared. No significant differences ($P = .414$) were observed between these percentages for both parasites (Fig. 1).

3.3. Factors Associated with EP Seropositivity

Variables considered potentially associated with exposure to *T. equi* and *B. caballi* were included in two different statistical models. The results of the final different statistical models and the effect of statistically significant variables ($P < .05$) are represented in Tables 2 and 3 for *T. equi* and *B. caballi*, respectively.

3.3.1. Theileria equi

There was evidence of significant clustering at the stud farm level. The model showed that *T. equi* seropositivity was significantly associated with the increase of horse age and with a greater number of stallions residing in the stud farm. Horses that underwent a vaccination program (equine influenza, tetanus, and equine herpesvirus [EHV]-1 or EHV-4) in their stud farms were significantly less likely to be *T. equi* seropositive (OR = 0.16, 95% CI 0.05–0.47 for vaccination against equine influenza and tetanus and OR = 0.30, 95% CI 0.12–0.76 for EHV-1 or EHV-4 vaccination). Horses residing in stud farms, where measures against insects and acari were applied, were five times more likely to have antibodies against *T. equi* (OR = 5.33, 95% CI 1.59–17.91).

3.3.2. Babesia caballi

In this model, there was no clustering at the stud farm level and therefore it was not included in the final model. Similarly to the model for *T. equi*, the main risk factors associated with seropositivity to *B. caballi* were the increase in age (OR = 1.11, 95% CI 1.02–1.22) and the presence of a greater number of stallions in the stud farm (OR = 5.99, 95% CI 1.75–20.49). A density population greater than 2,500 horses/km² was significantly associated with the increase of *B. caballi* seropositives (OR = 5.81, 95% CI 1.95–17.29). Factors associated with decreased odds of being *B. caballi* seropositive were the separation of mares and young horses (1–2 years) in different areas (OR = 0.22, 95% CI 0.07–0.71) and the use of disinfection measures in the stables and breeding areas (OR = 0.11, 95% CI 0.04–0.31).

4. Discussion

The area of central Spain is a high-risk area in terms of transmission of equine infectious diseases due to the fact that horses being exported to continental Europe or abroad often stop in this area [21]. Besides, it is the area in Spain where the majority of national and international equestrian competitions are held [19]. This is the first study to define the seroprevalence and risk factors associated with the seropositivity to EP in the SP breeding horse population in central Spain.

In central Spain, *T. equi* seroprevalence was higher than that for *B. caballi* (22.6% vs. 4.6%). Our results were in agreement with a recent study carried out in 2016 in our laboratory that included samples from horses of different breeds for preexportation purposes in a wide area of Spain, showing seroprevalences of 21.9% for *T. equi* and 5.0% for *B. caballi*, using the same competitive inhibition ELISA from the present study [12] but were lower than those published in the north-west (*T. equi*: 40.0%; *B. caballi*: 28.3% using an Indirect fluorescent antibody test) [10], south (*T. equi*: 50.3%; *B. caballi*: 11.4% using a competitive inhibition ELISA) [9], and the west of the country (*T. equi*: 44.5%; *B. caballi*: 20.7% using an Indirect fluorescent antibody test) [11], suggesting that different areas in Spain may have different exposures to both parasites and that a wider study comprising the whole country should be carried out in SP horses. Our results would be similar to those determined in Italy and Portugal [14,31], suggesting that countries in southern Europe have a high exposure to EP than other countries in Europe such as Switzerland and Germany [32].

Stallions had a similar seroprevalence to mares for both parasites (*T. equi*: 24.9% vs. 20.8% respectively; *B. caballi*: 4.3% vs. 4.8% respectively), and no significant association was found between seropositivity to *T. equi* or *B. caballi* and sex in the models; similarly to studies in Brazil [33], and Hungary [34].

A comparison of the cELISA inhibition percentages was performed in our study with the hypothesis that the percentages in *T. equi* would be higher and more homogeneous than those in *B. caballi* [12]. Even though this fact was observed, no significant differences ($P = .41$) between both distributions were found (Fig. 1). In our opinion, the cELISA tests used in our study would not be valid to assess the level of antibodies in a horse, and they should be interpreted as a qualitative diagnostic test.

In this study, the analysis of the risk factors associated with the seroprevalence of EP showed that the increase in horse age had a statistically significant association with the seropositivity to both *T. equi* ($P < .001$) and *B. caballi* ($P = .017$). Our findings were similar to other EP studies [16,35]. Because EP is a widespread disease and it is difficult to control in a stud farm [36], the older a horse gets, the more likely it is that the horse will have a exposure to *T. equi* or *B. caballi*. In addition, it is known that the infection with *T. equi* can be life-long in some horses or last for 1–4 years in case of infection with *B. caballi* [29,37], which involves that the older horses are more likely to get an exposure to *T. equi*.

The increase in the number of stallions residing in the stud farm was also a risk factor included in both models (*T. equi* $P = .008$ and

Table 1

True seroprevalence, seroprevalence in male and female horses, and sex-standardized seroprevalence (adjusted for clustering at the stud farm level) for *Theileria equi*, *Babesia caballi*, *T. equi* + *B. caballi*, and *T. equi* or *B. caballi* in SP breeding horses in central Spain ($n = 536$).

Parasite Type	Observed Seroprevalence	Seroprevalence in Males	Seroprevalence in Females	Sex-Standardized Seroprevalence
<i>T. equi</i>	22.6% (95% CI 19.1%–26.1%)	24.9% (95% CI 19.3%–30.4%)	20.8% (95% CI 16.4%–25.3%)	21.9% (95% CI 14.6%–29.4%)
<i>B. caballi</i>	4.6% (95% CI 2.8%–6.3%)	4.3% (95% CI 1.7%–6.9%)	4.8% (95% CI 2.4%–7.1%)	4.6% (95% CI 0.8%–8.4%)
<i>T. equi</i> + <i>B. caballi</i>	2.0% (95% CI 0.9%–3.2%)	2.2% (95% CI 0.3%–4.1%)	1.9% (95% CI 0.4%–3.4%)	2.4% (95% CI 0.0%–4.9%)
EP (<i>T. equi</i> / <i>B. caballi</i>)	24.9% (95% CI 21.3%–28.6%)	26.7% (95% CI 21.1%–32.4%)	23.6% (95% CI 18.9%–28.3%)	24.1% (95% CI 15.9%–32.2%)

Abbreviations: CI, confidence interval; EP, equine piroplasmosis; SP, Spanish Purebred.

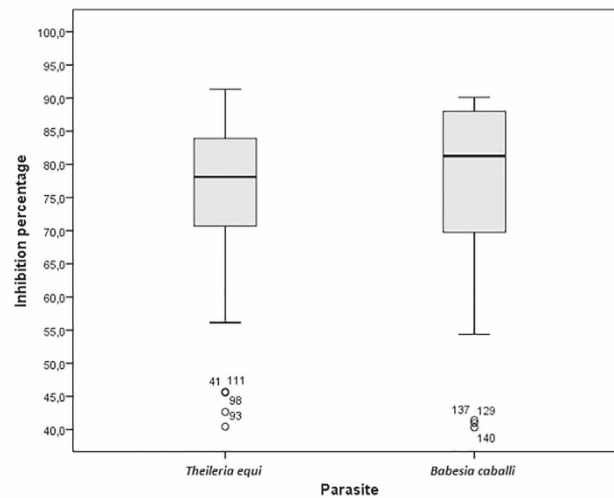


Fig. 1. Comparison between the inhibition percentage results of both cELISAs (*Theileria equi* and *Babesia caballi*) in all the horses sampled by using the Mann–Whitney *U* test.

B. caballi $P = .004$). Stallions are mainly used for sport and are under more pressure than mares in their daily routine to be prepared for competitions or for being sold, so the stress and the associated immunosuppression could aid to acquire the infection in case of exposure to the parasites [38].

Other significantly associated risk factors in the *T. equi* model were the application of measures to eliminate insects and acari in the stud farm ($P = .007$) and the implementation of vaccination programs against EHV-1/4 ($P = .011$), equine influenza, and tetanus ($P = .001$) in all the horses residing in the premises. Our results showed that the use of acaricides, insecticides, and insect traps in the stables were implemented in stud farms with a high *T. equi* seroprevalence, probably following the occurrence of acute infection or the presence of seropositive horses in the stud farm. The use of insecticides and acaricides as a protective factor against EP has been discussed previously by others authors without consistent results [39,40]; however, in our study, this control measure was likely to have been implemented in the stud farms as a result of a

preexisting problem in the premises and probably had no effect on the already seropositive horses. Regarding the apparently protective effect of the implementation of vaccination programs in the stud farms of our study, vaccination could aid to improve the immune status of horses [9] and could also be a sign of a good overall health management in a stud farm.

In the model for *B. caballi*, a density population greater than 2,500 horses/km² was considered as a risk factor associated with the increase of *B. caballi*-seropositive cases ($P = .002$). This could be related to a greater probability of transmission of the disease by ticks due to a closer contact between horses [6]. Risk factors associated with a decrease of *B. caballi* seropositives included the use of disinfection measures in the premises ($P = .001$), in agreement with the results obtained in Brazil, where horses stabled in a rural area with poor farming conditions and limited disinfection measures had a higher load of ticks [40,41]. Finally, our study is the first report where the separation of pregnant mares and young horses (1–2 years) in different areas of the stud farm is suggested as a

Table 2

Output of the final mixed-effects multivariable logistic regression model of risk factors for *Theileria equi* in SP breeding horses in central Spain ($n = 536$; 117 seropositive and 419 seronegative).

Variable	<i>T. equi</i> -Positive ($n = 117$)	<i>T. equi</i> -Negative ($n = 419$)	OR (95% CI)	P-Value
Horse's age (continuous)	-	-	1.17 (1.11–1.24)	<.001
Number of SP breeding stallions in the stud farm				
<2	55	200	Reference	
≥2	62	219	3.71 (1.41–9.74)	.008
Equine influenza + tetanus vaccination in the stud farm				
No	53	107	Reference	
Yes	64	312	0.16 (0.05–0.47)	.001
EHV-1/EHV-4 vaccination in the stud farm				
No	65	129	Reference	
Yes	52	290	0.30 (0.12–0.76)	.011
Measures against insects and acari in the stables/farm				
No	14	89	Reference	
Yes	103	330	5.33 (1.59–17.91)	.007

Abbreviations: CI, confidence interval; EHV, equine herpesvirus; OR, odds ratio; SP, Spanish Purebred.

Table 3Output of the final mixed-effects logistic regression model of risk factors for *Babesia caballi* in SP horses in central Spain (n = 536; 25 seropositive and 511 seronegative).

Variable	<i>B. caballi</i> -Positive (n = 25)	<i>B. caballi</i> -Negative (n = 511)	OR (95% CI)	P-Value
Horse's age (continuous)	-	-	1.11 (1.02–1.22)	.017
Number of SP breeding stallions in the stud farm				
<2	4	251	Reference	
≥2	21	260	5.99 (1.75–20.49)	.004
Horse density of population				
<2,500	18	466	Reference	
≥2,500	7	45	5.81 (1.95–17.29)	.002
Mares and young horses (1–2 y) in separated groups				
No	21	217	Reference	
Yes	4	294	0.22 (0.07–0.71)	.012
Disinfection stables/farm				
No	10	73	Reference	
Yes	15	438	0.11 (0.04–0.31)	.001

Abbreviations: CI, confidence interval; OR, odds ratio; SP, Spanish Purebred.

factor that could decrease the number of EP-seropositive horses ($P = .012$); this factor has been shown to reduce the risk of other diseases, such as Equine Herpesvirus type 1 and/or 4 [25]. The hormonal changes associated with pregnancy and partum in these mares could also trigger long-term or persistent infections (*T. equi*) and reactivate piroplasms sequestered in the bone marrow, which could then be transmitted to young horses (naïve population) by ticks [42].

5. Conclusions

An overall EP true seroprevalence of 24.9% was estimated in SP breeding horses in central Spain, with horses being more exposed to *T. equi* than to *B. caballi* infection. Thus, central Spain can be considered as high-risk area for EP. Several risk factors associated with EP were identified. The increase in horse age and the number of stallions residing in the stud farm were related to a higher seroprevalence for both *T. equi* and *B. caballi*, whereas the implementation of vaccination programs for other diseases or the separation of pregnant mares from young horses (1–2 years) were associated with a lower number of seropositives to *T. equi* and *B. caballi*, respectively. These factors should be taken into account to implement control measures in the stud farms. Further studies on EP in SP horses are required in other areas of Spain to corroborate our findings and further evaluate the role of these and other risk factors associated with EP seropositivity.

Acknowledgments

We are grateful to the technicians and the IT department at the VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense, Madrid, Spain, for their help in the processing of the samples and the editing the figure included in the manuscript. We are also grateful to all the veterinary surgeons and stud farm owners that participated in this study.

Financial disclosure.

E.C. was supported by the Grants for Predoctoral Researchers of the Complutense University of Madrid (CT27/16).

References

- [1] Sterner KE, Blood DC, Radostits OM, Henderson JA. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 6th edition. London: Bailliere Tindall; 1985.
- [2] Maurer FD. Equine piroplasmosis-another emerging disease. J Am Vet Med Assoc 1962;141:699.
- [3] Wise LN, Kappmeyer LS, Mealey RH, Knowles DP. Review of equine piroplasmosis. J Vet Intern Med 2013;27:1334–46.
- [4] Zobba R, Ardu M, Nicolini S, Chessa B, Manna L, Cocco R, et al. Clinical and laboratory findings in equine piroplasmosis. J Equine Vet Sci 2008;28:301–8.
- [5] Stiller D, Coan ME. Recent developments in elucidating tick vector relationships for anaplasmosis and equine piroplasmosis. Vet Parasitol 1995;57:97–108.
- [6] Ueti MW, Palmer GH, Scoles GA, Kappmeyer LS, Knowles DP. Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the apicomplexan parasite *Babesia equi*. Infect Immun 2008;76:3525–9.
- [7] Ueti MW, Mealey RH, Kappmeyer LS, White SN, Kumpula-McWhirter N, Pelzel AM, et al. Re-emergence of the apicomplexan *Theileria equi* in the United States: elimination of persistent infection and transmission risk. PLoS One 2012;7:e44713.
- [8] Wise LN, Pelzel-McCluskey AM, Mealey RH, Knowles DP. Equine piroplasmosis. Vet Clin North Am Equine Pract 2014;30:677–93.
- [9] García-Bocanegra I, Arenas-Montes A, Hernández E, Adaszek L, Carbonero A, Almería S, et al. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. Vet J 2013;195:172–8.
- [10] Camacho AT, Guitián FJ, Pallas E, Gestal JJ, Olmeda AS, Habela MA, et al. *Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain. Trop Anim Health Pro 2005;37:293–302.
- [11] Montes Cortes MG, Fernandez-Garcia JL, Habela Martinez-Estellez MA. Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Spain. Parasite 2017;24:14.
- [12] Camino ECK, Lozano FJ, Viñolo C, Alende T, Domínguez L, Cruz F. Estudio de seroprevalencia de piroplasmosis equina en España en muestras previas a la exportación. XXI Simposio Anual Avedilla. Murcia: Asociación de Veterinarios Especialistas en Diagnóstico de Laboratorio; 2016.
- [13] Sumbria D, Singla LD, Kumar S, Sharma A, Dahiya RK, Setia R. Spatial distribution, risk factors and haemato-biochemical alterations associated with *Theileria equi* infected equids of Punjab (India) diagnosed by indirect ELISA and nested PCR. Acta Trop 2016;155:104–12.
- [14] Ribeiro AJ, Cardoso L, Maia JM, Coutinho T, Cotovio M. Prevalence of *Theileria equi*, *Babesia caballi*, and *Anaplasma phagocytophilum* in horses from the north of Portugal. Parasitol Res 2013;112:2611–7.
- [15] Moretti A, Mangili V, Salvatori R, Maresca C, Scoccia E, Torina A, et al. Prevalence and diagnosis of *Babesia* and *Theileria* infections in horses in Italy: a preliminary study. Vet J 2010;184:346–50.
- [16] Kouam MK, Kantzoura V, Gajadhar AA, Theis JH, Papadopoulos E, Theodoropoulos G. Seroprevalence of equine piroplasms and host-related factors associated with infection in Greece. Vet Parasitol 2010;169:273–8.
- [17] Sevinc F, Maden M, Kumas C, Sevinc M, Ekici OD. A comparative study on the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horse sub-populations in Turkey. Vet Parasitol 2008;156:173–7.
- [18] Heuchert CM, de Giull Jr V, de Athaide DF, Bose R, Friedhoff KT. Seroprevalence studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. Vet Parasitol 1999;85:1–11.
- [19] Anon. Estudio del impacto del sector ecuestre en España. Madrid, Spain: Real Federación Hípica Española; 2013.
- [20] Cruz F, Fores P, Ireland J, Moreno MA, Newton R. Freedom from equine infectious anaemia virus infection in Spanish Purebred horses. Vet Rec Open 2015;2:e000074.
- [21] Cruz F, Fores P, Mughini-Gras L, Ireland J, Moreno MA, Newton R. Seroprevalence and factors associated with seropositivity to equine arteritis virus in Spanish Purebred horses in Spain. Equine Vet J 2016;48:573–7.
- [22] Anon. Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente. Programa ARCA Spain: Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente; 2012.
- [23] Rubel F, Kottek M. Observed and projected climate shifts 1901–2100 depicted by world maps of the Köppen-Geiger climate classification. Meteorol Z 2010;19:135–41.
- [24] Thrusfield M. Veterinary epidemiology. 2nd ed. Oxford, UK: Blackwell Science; 2005.
- [25] Cruz F, Fores P, Mughini-Gras L, Ireland J, Moreno MA, Newton JR. Seroprevalence and factors associated with equine herpesvirus type 1 and 4 in Spanish Purebred horses in Spain. Vet Rec 2016;178:398.

- [26] Dohoo I, Martin W, Stryhn H. Veterinary epidemiologic research. 2nd ed. Prince Edward Island: VER Inc; 2010.
- [27] Claeskens G, Aerts M, Molenberghs G. A quadratic bootstrap method and improved estimation in logistic regression. *Stat Probab Lett* 2003;61:383–94.
- [28] Hosmer DW, Lemeshow S, editors. Applied logistic regression. 2nd ed. New York, USA: Wiley Interscience Press; 2000. p. 143–88.
- [29] Bruning A. Equine piroplasmosis an update on diagnosis, treatment and prevention. *Br Vet J* 1996;152:139–51.
- [30] Weiland G. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Vet Parasitol* 1986;20:43–8.
- [31] Bartolome Del Pino LE, Nardini R, Veneziano V, Iaconi F, Cersini A, Autorino GL, et al. Babesia caballi and Theileria equi infections in horses in Central-Southern Italy: sero-molecular survey and associated risk factors. *Ticks Tick Borne Dis* 2016;7:462–9.
- [32] Sigg I, Gerber V, Gottstein B, Doherr MG, Frey CF. Seroprevalence of Babesia caballi and Theileria equi in the Swiss horse population. *Parasitol Int* 2010;59:313–7.
- [33] Ferreira EP, Vidotto O, Almeida JC, Ribeiro LPS, Borges MV, Pequeno WHC, et al. Serological and molecular detection of Theileria equi in sport horses of northeastern Brazil. *Comp Immunol Microb* 2016;47:72–6.
- [34] Farkas R, Tanczos B, Gyurkovszky M, Foldvari G, Solymosi N, Edelhofer R, et al. Serological and molecular detection of Theileria equi infection in horses in Hungary. *Vet Parasitol* 2013;192:143–8.
- [35] Ruegg SR, Torgerson P, Deplazes P, Mathis A. Age-dependent dynamics of Theileria equi and Babesia caballi infections in southwest Mongolia based on IFAT and/or PCR prevalence data from domestic horses and ticks. *Parasitology* 2007;134:939–47.
- [36] Thompson PH. Ticks as vectors of equine piroplasmosis. *J Am Vet Med Assoc* 1969;155:454.
- [37] Dewaal DT. Equine piroplasmosis - a review. *Br Vet J* 1992;148:6–14.
- [38] Salim BO, Hassan SM, Bakheit MA, Alhassan A, Igarashi I, Karanis P, et al. Diagnosis of Babesia caballi and Theileria equi infections in horses in Sudan using ELISA and PCR. *Parasitol Res* 2008;103:1145–50.
- [39] Guidi E, Pradier S, Lebert I, Leblond A. Piroplasmosis in an endemic area: analysis of the risk factors and their implications in the control of Theileriosis and Babesiosis in horses. *Parasitol Res* 2015;114:71–83.
- [40] Dos Santos TM, Roier EC, Santos HA, Pires MS, Vilela JA, Moraes LM, et al. Factors associated to Theileria equi in equids of two microregions from Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011;20:235–41.
- [41] Vieira TS, Vieira RF, Finger MA, Nascimento DA, Sicupira PM, Dutra LH, et al. Seroepidemiological survey of Theileria equi and Babesia caballi in horses from a rural and from urban areas of Parana State, southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 2013;4:537–41.
- [42] Sant C, d'Abadie R, Pargass I, Basu AK, Asgarali Z, Charles RA, et al. Prospective study investigating transplacental transmission of equine piroplasmosis in thoroughbred foals in Trinidad. *Vet Parasitol* 2016;226:132–7.

4.2 Estudio nacional

4.2.1 Artículo 2: Estudio sero-molecular y factores de riesgo asociados a la piroplasmosis equina en caballos residentes en España

Referencia publicación: doi.org/10.1111/evj.13348. Este artículo está en prensa. El artículo fue aceptado el 27 de agosto de 2020 para su publicación, pero está a la espera de ser editado en un número concreto de la revista "*Equine Veterinary Journal*" [factor de impacto 2019: 2.477, cuartil 2019: Q1, ranking 2019: 9/142 (*Veterinary Sciences*)].

Resumen:

Theileria equi y *Babesia caballi* son protozoos intraeritrocitarios que causan la piroplasmosis equina, enfermedad principalmente transmitida por garrapatas de los géneros *Rhipicephalus*, *Hyalomma* y *Dermacentor*; aunque también se han descrito otras vías de transmisión como las transfusiones de sangre o el uso compartido de agujas contaminadas. El diagnóstico de la PE puede llevarse a cabo utilizando métodos directos (frotis sanguíneo y PCR) o indirectos/serológicos (cELISA, IFI y FC). Esta enfermedad es responsable de restricciones en el movimiento de caballos a otros países debido a que un gran número de individuos permanecen como portadores de estos parásitos después de superar la infección, mostrando una baja parasitemia y niveles detectables de anticuerpos en sangre.

Pese a que se han identificado numerosos casos de PE durante décadas en España, solo se conoce el nivel de exposición a *T. equi* y *B. caballi* en determinadas regiones de la península ibérica. Así pues, el objetivo de este estudio fue describir la situación epidemiológica actual de la PE en todo el territorio nacional, además de identificar factores de riesgo asociados a la presencia de anticuerpos frente a dichos parásitos. Mediante la realización de un muestreo aleatorio estratificado por CCAA en función del censo de caballos existente en el año 2013, un total de 740 caballos aparentemente

sanos fueron examinados por medio de análisis serológicos (cELISA y FC) y moleculares (PCR a tiempo real de tipo *mutiplex*). Para la identificación de factores de riesgo se construyeron dos modelos de regresión logística utilizando los datos recogidos en cuestionarios con preguntas relativas tanto al propio individuo como a la explotación de alojamiento.

Alrededor de un 42% (95% IC 38.3-45.4) de los caballos resultaron seropositivos a PE, mientras que la prevalencia fue estimada en un 30.3% (95% IC 27.0-33.6). Aunque se encontró un nivel de acuerdo elevado entre las dos técnicas serológicas ($k = 0.721$), se diagnosticó un mayor número de casos positivos a PE mediante cELISA ($p < 0.001$), sugiriendo una menor sensibilidad de la FC o la existencia de un número elevado de caballos crónicamente infectados. La exposición a *T. equi* fue estadísticamente superior ($p < 0.001$) a la de *B. caballi*, siendo Navarra y Extremadura las CCAA con mayores niveles de positividad a PE, y Castilla La Mancha, Andalucía y la parte este del país las regiones con los niveles más bajos. Este hecho podría estar relacionado con los cuidados que reciben los caballos para prevenir el contacto con las garrapatas y con el tipo de clima presente en cada una de las regiones, lo cual influye en la abundancia y tasa de infección de estos vectores. El análisis estadístico reveló que el aumento en la edad de los caballos, la presencia de garrapatas y las razas ibéricas o cruzadas son factores de riesgo relacionados con una mayor exposición a *T. equi*; mientras que el incremento de los casos seropositivos a *B. caballi* se asoció al contacto cercano con ganado. Sin embargo, la vacunación frente al tétanos y la asistencia a ferias, competiciones u otras actividades podrían ser factores responsables de una reducción del número de casos positivos a *T. equi* y *B. caballi*, respectivamente.

Los resultados de este estudio resaltan la importancia que tiene la PE en nuestro país ya que cerca de la mitad de los caballos analizados demostraron una exposición a *T. equi* y/o *B. caballi* y un tercio del total resultaron ser portadores asintomáticos de estos parásitos, pudiendo actuar como propagadores de esta enfermedad. Estudios relativos a la ecología y distribución de las garrapatas podrían ser útiles para planificar medidas adicionales de prevención y control de la PE.

Sero-molecular survey and risk factors of equine piroplasmosis in horses in Spain

Eliazar Camino^{1,2}  | Aranzazu Buendia¹ | Abel Dorrego¹ | Pilar Pozo³ |
Lucía de Juan^{1,2} | Lucas Dominguez^{1,2} | Fatima Cruz-Lopez¹ 

¹VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense, Madrid, Spain

²Animal Health Department, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain

³MAEVA SERVET, S.L, Alameda del Valle, Spain

Correspondence

Eliazar Camino, VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense, Madrid, Spain.
Email: eliazar.camino@ucm.es

Funding information

E. Camino was supported by the Grants for Predoctoral Researchers of the Complutense University of Madrid (CT27/16).

Abstract

Background: *Theileria equi* and *Babesia caballi* cause equine piroplasmosis (EP), one of the most important tick-borne diseases of horses due to its high negative impact to the equine industry. Although infections with these parasites have been reported for decades in Spain, epidemiological studies have only been carried out in certain regions.

Objectives: To determine the (sero)prevalence of these parasites in asymptomatic horses nationwide in Spain and to identify potential individual and environmental factors associated with seropositivity to EP.

Study design: Sample size was calculated according to the horses registered in Spain in 2013 and by autonomous community using a random stratified sampling. A questionnaire was used to collect data on factors associated with EP seropositivity.

Methods: Serological (cELISA and complement fixation test) and molecular (real-time PCR) analyses were carried out in 740 horses. Risk factors were identified computing two independent logistic regression models with the collated data.

Results: Antibodies against EP were detected in 42.9% (95% CI 39.4–46.5) of horses, whereas 30.3% (95% CI 27.0–33.6) were EP positive by PCR. A substantial strength of agreement ($k = 0.721$) was estimated between serological tests. Exposure to *T. equi* was significantly higher than to *B. caballi* and the highest (sero)prevalence was detected in the northern communities. Increasing horse age, presence of ticks and contact with cows were factors related to EP seropositivity in the horses, whereas tetanus vaccination and fairs attendance were associated with lower seropositivity.

Conclusions: Almost half of the horses residing in Spain had antibodies against EP or circulating parasitaemia. Appropriate prevention measures and implementation of a EP surveillance programme should be considered in order to reduce and control the infection.

KEYWORDS

horse, equine piroplasmosis, cELISA, CFT, real-time PCR, risk factors, Spain

1 | INTRODUCTION

Equine piroplasmosis (EP) is caused by two species of intraerythrocytic protozoa termed *Babesia caballi* and *Theileria equi*, or by a mixed infection of both parasites.^{1,2} EP is endemic in tropical and temperate areas and is transmitted by several tick vectors of the *Ixodes*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus* and *Hyalomma* genera.^{3,4} Both protozoan parasites can cause hyperacute (sudden death), acute, subacute or chronic infections with variable clinical signs including fever, depression, anorexia, anaemia, icterus, oedema, weight loss and poor exercise tolerance.⁵ The diagnosis requires the identification of one or both parasites by means of stained blood smears and/or molecular techniques; on the other hand, serological tests such as cELISA, complement fixation test (CFT) and immunofluorescence antibody test (IFAT) may be used to demonstrate exposure.⁶ CFT can detect antibody titres from 8 to 11 days after infection and, although it is a very specific test, it lacks sensitivity in chronic or inapparent EP. Antibody responses by IFAT occur at about 3–20 days post infection. This test also has a high specificity and it is considered to be more sensitive than the CFT during chronic infection. cELISA is the most sensitive test recommended by the OIE for the detection of chronic EP infections.⁷ Horses surviving the acute phase or after treatment may remain as inapparent carriers for years (*B. caballi*) or lifelong (*T. equi*), with detectable antibody levels and low levels of parasitaemia. These horses can be a source of infection for tick vectors and naïve equids, and their international movement is restricted.⁷ The latter is particularly important for the Spanish equine industry due to the fact that a large number of horses (mainly, Spanish Purebred) are exported to countries free from EP; in a recent study, 24.1% of horses presented a positive EP cELISA test prior to exportation, therefore, limiting their exportation.⁸

EP has been reported in Spanish native horses for decades.^{9–11} However, the seroprevalence, molecular identification and epidemiological situation of these equine haemoparasites have only been described in limited regions of Spain.^{4,12–16} Therefore, our main objective was to develop a greater knowledge of the current epidemiological status of this disease by conducting the largest EP study to date in Spain. In this study, the (sero)prevalence of *T. equi* and *B. caballi* in asymptomatic horses was determined, and potential horse and farm risk factors associated with the occurrence of seropositive cases were identified.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Sampling procedures and data collection

The sampling in this study was conducted from February 2018 to July 2019, taking into account the minimum sample size (730 horses) calculated using the formula for a finite population,¹⁷ on the basis of the number of horses registered in Spain (723,082) in 2013,¹⁸ an expected *T. equi* seroprevalence of 21.9%,¹⁹ with 95% confidence interval (CI) and 3% maximum error.¹⁷ The sample size was stratified by Spanish

autonomous communities in order to determine the number of horses to be sampled, based on the horse census in each community (Table 1). A total of 740 samples were taken from asymptomatic horses older than 8 months of age. Every veterinarian recruited in this survey randomly collected blood samples from 10 horses residing in at least two different farms. From each horse, 10 mL of blood with EDTA and 10 mL of blood without anticoagulant were submitted. Furthermore, a questionnaire designed to cover the main characteristics of each sampled horse and its farm was completed by the veterinarians (with the help of the horse owner when needed) (Supplementary Item 1).

2.2 | Serological tests (cELISA and CFT)

Tubes without anticoagulant were centrifuged to collect serum, which was tested to detect equine IgG-specific antibodies against *T. equi* and *B. caballi* parasites by using specific commercial cELISA kits for each parasite, according to manufacturer's instructions: *Theileria equi* and *Babesia caballi* Antibody Test Kits (VMRD Inc., Pullman, Washington, USA).²⁰ Results were calculated from the optical densities measures at 620 nm and expressed as IP. Sera were classified as positive (IP $\geq$ 40%) or negative (IP < 40%).

Serum samples were also used for the determination of complement fixing IgM-specific antibodies against these equine parasites according to guidelines in the Terrestrial Animals Manual of the World Organisation for Animal Health.²¹ Briefly, following a heat

TABLE 1 Horse population registered in each Spanish autonomous community and number of samples collected and tested by serology (cELISA and CFT) and real-time PCR in this study

Autonomous community	Horse population ^a	Samples collected and analysed
Andalusia	257 633	241
Aragon	10 903	13
Asturias	48 533	38
Balearic Islands	8753	9
Canary Islands	765	10
Cantabria	46 229	39
Castile La Mancha	29 361	65
Castile and Leon	74 222	79
Catalonia	33 740	46
Valencia	24 506	33
Extremadura	42 433	40
Galicia	32 680	30
La Rioja	7715	10
Madrid	19 863	38
Murcia	14 157	10
Navarre	34 887	16
Basque Country	36 702	23
Total	723 082	740

^aData from a study about the impact of the equestrian sector in Spain.¹⁸

inactivation at 56°C for 30 minutes, serum samples were diluted in veronal buffer in a microtitre plate and mixed with *T. equi*/*B. caballi* antigen (provided by National Veterinary Services Laboratories or NVSL, Ames, Iowa, USA) and complement (previously prepared and titrated spectrophotometrically at 50% haemolytic dose). The mixture was incubated for 1 hour at 37°C. Thereafter, a haemolytic indicator, consisting of equal parts of a 2% sheep erythrocytes suspension and veronal buffer with five minimum haemolytic doses of haemolysin, was added and the mixture incubated for another 45 minutes at 37°C. The microtitre plate was centrifuged for 5 minutes at 300×g. A lysis of ≤50% was considered positive at titre 1/5.

2.3 | DNA extraction

Total genomic DNA was extracted from 200 µL EDTA blood using the QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Germantown, Maryland, USA), according to the manufacturer's protocol. Extracted DNA was preserved at -40°C until the multiplex real-time PCR was carried out.

2.4 | Multiplex real-time PCR assay

Extracted DNA was thawed and screened by multiplex real-time PCR using primers and TaqMan probes for the simultaneous and specific detection of the 18S rRNA gene of *T. equi* and *B. caballi* following the conditions described by Camino et al.²² PCR amplicons from two horses positive to *T. equi* or *B. caballi* PCR were purified and sent to Eurofins Genomics (Germany) for Sanger sequencing of the 18S rRNA gene. The identification of the sequences obtained from these horses was achieved using the basic local alignment search tool (BLAST), comparing with sequences deposited in the non-redundant National Center for Biotechnology Information²³ database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). These two samples were used as positive controls, whereas RNase-free water was used as negative control.

2.5 | Data analysis

According to the horse census published by Deloitte¹⁸ and the estimates of sensitivity and specificity of Celisa,²⁰ CF test (data derived from this study) and PCR assay,²² WinEpi software (Zaragoza, Spain) was used to calculate the true (sero)prevalence of EP/*T. equi*/*B. caballi* nationwide and by Spanish community, although seroprevalence by community was only calculated using cELISA results. For both parasites, serological (cELISA and CFT) and PCR data were analysed (IBM SPSS Statistics software version 20.0, IBM, New York, USA) using Chi-square test (χ^2), and kappa coefficient (κ) was calculated to determine the level of agreement among cELISA-CFT, cELISA-PCR and CFT-PCR.²⁴

In order to identify horse and farm variables (risk factors) associated with cELISA positivity to *T. equi*/*B. caballi*, two independent multivariable logistic regression models were performed using the software Small STATA version 12.0 (StataCorp, Texas, USA).

Continuous variables were assessed for linearity and those with no evidence for linearity were categorised into biologically plausible categories when no natural categorisation existed. Individual variables were screened in univariate regression models and those with $P \leq .25$ were included in the full multivariate starting model. Stepwise backward variable selection procedure retained variables with a P value $<.05$ in the final model and biologically significant plausible first-order interactions were included. Hosmer-Lemeshow goodness of fit and the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve were computed.²⁵

3 | RESULTS

This survey was conducted on 740 asymptomatic horses resident in Spain. Serological (cELISA and CFT) and molecular (real-time PCR) analyses were carried out in all 740 horses (Table 1). cELISA tests revealed that a total of 304 horses showed antibodies to EP, with a true seroprevalence of 42.9% (95% CI 39.4-46.5). The true seroprevalence of *T. equi* and *B. caballi* in these animals was 35.8% (95% CI 32.3-39.2) and 15.6% (95% CI 13.0-18.2) respectively. Furthermore, 8.9% (95% CI 6.9-11.0) horses tested seropositive for both piroplasmids.

Regarding CFT, a total of 262 horses (41.8%; 95% CI 38.3-45.4) were EP positive, being 34.3% (95% CI 30.9-37.7) *T. equi* positive, 15.6% (95% CI 13.0-18.3) *B. caballi* positive and 4.8% (95% CI 3.3-6.4) positive for both parasites. For this assay, a sensitivity of 80.3% (95% CI 75.4-85.2) (*T. equi*) and 45.7% (95% CI 36.6-54.8) (*B. caballi*) and a specificity of 96.9% (95% CI 95.4-98.5) (*T. equi*) and 93.9% (95% CI 92.0-95.8) (*B. caballi*) were estimated in this study.

A positive PCR for EP was found in 191 horses (30.3%; 95% CI 27.0-33.6), while the PCR positivity rates for *T. equi*, *B. caballi* and both piroplasms were 29.0% (95% CI 25.7-32.3), 1.8% (95% CI 0.9-2.8) and 0.7% (95% CI 0.1-1.3) respectively.

The number of *T. equi* positive horses was significantly higher ($P < .001$) than *B. caballi* using any of the three techniques described above. Moreover, a higher significant number of EP infected horses were diagnosed by cELISA than by CFT and PCR ($P < .001$) for both *T. equi* and *B. caballi* ($P < .001$). A substantial strength of agreement ($\kappa = 0.721$) between cELISA-CFT was obtained for the diagnostic of EP, being higher for the detection of *T. equi* ($\kappa = 0.799$) than for *B. caballi* ($\kappa = 0.434$) infections. Kappa value between cELISA-PCR was also substantial for EP ($\kappa = 0.642$) and *T. equi* ($\kappa = 0.721$), and slight for *B. caballi* ($\kappa = 0.127$). However, concordance between CFT-PCR was moderate for EP ($\kappa = 0.525$) and *T. equi* ($\kappa = 0.598$), and also slight for *B. caballi* ($\kappa = 0.147$).

3.1 | True seroprevalence by autonomous community

Theileria equi seroprevalence ranged from 0.0% (Balearic Islands, Murcia) to 59.0% (95% CI 34.9-83.1) in Navarre (Figure 1A), whereas *B. caballi* seroprevalence varied from 0.0% (Aragon, Valencia,

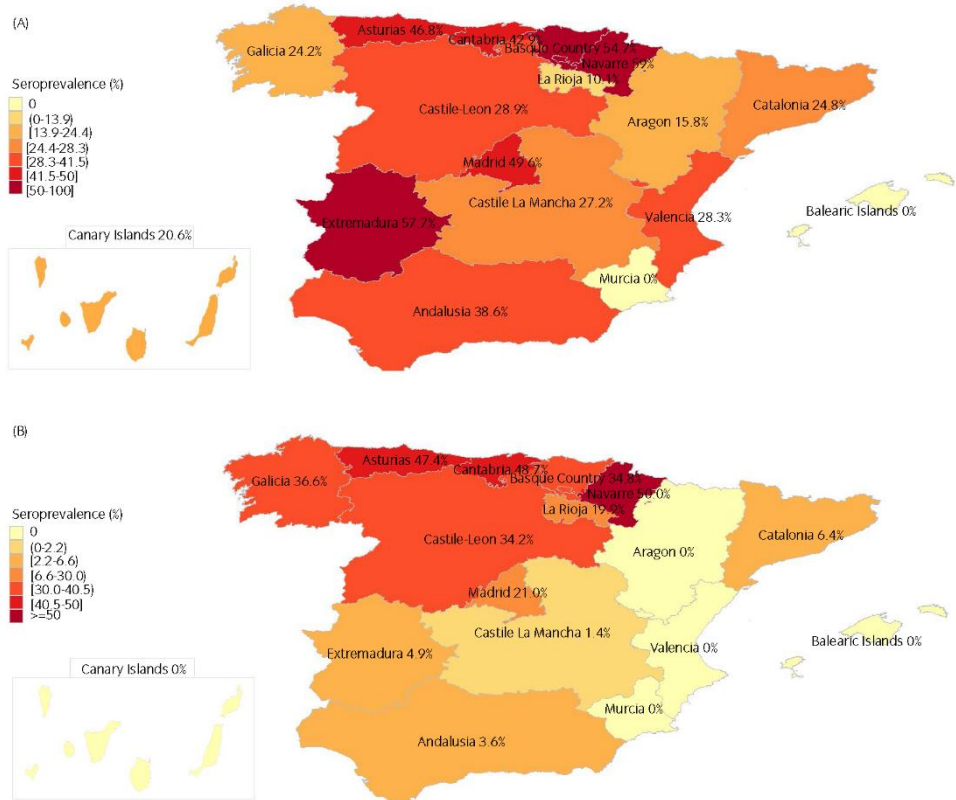


FIGURE 1 True seroprevalence levels obtained in each autonomous community for *T. equi* (A) and *B. caballi* (B)

Balearic Islands, Canary Islands and Murcia) to 50.0% (95% 25.5-74.5) in Navarre (Figure 1B).

3.2 | True prevalence by autonomous community

Theileria equi PCR positivity ranged from 0.0% (Balearic Islands, Murcia and La Rioja) to 66.1% (95% CI 42.9-89.3) in Navarre (Figure 2A). *B. caballi* was only found in 7 of 17 Spanish communities, being Navarre (6.8%, 95% CI 0.0-19.2) the community with the highest PCR prevalence (Figure 2B).

3.3 | Factors associated with cELISA positivity

All tested variables with their frequencies are provided in Supplementary Item 2. The final statistical models with the effect

of statistically significant variables ($P < 0.05$) are represented in Tables 2 (*T. equi*) and 3 (*B. caballi*). The Hosmer-Lemeshow goodness-of-fit test indicated that the multivariable logistic regression models fitted the data adequately (*T. equi*: $P = .79$; *B. caballi*: $P = .71$). The area under the ROC curve was 0.70 for *T. equi* and 0.87 for *B. caballi* models, indicating acceptable and good overall predictive power respectively.

3.4 | Risk factors for *T. equi*

According to the model (Table 2), *T. equi* seropositivity was significantly associated with the increase in horse age (OR = 1.06; 95% CI 1.03-1.10) and with the presence of ticks on the horse (OR = 2.36; 95% CI 1.62-3.43). In comparison with Central-European horses, Crossbreed and Iberian horses were 3.57 (95% CI 2.04-6.25) and 2.80 times (95% CI 1.66-4.72) more likely to be *T. equi* seropositive respectively.

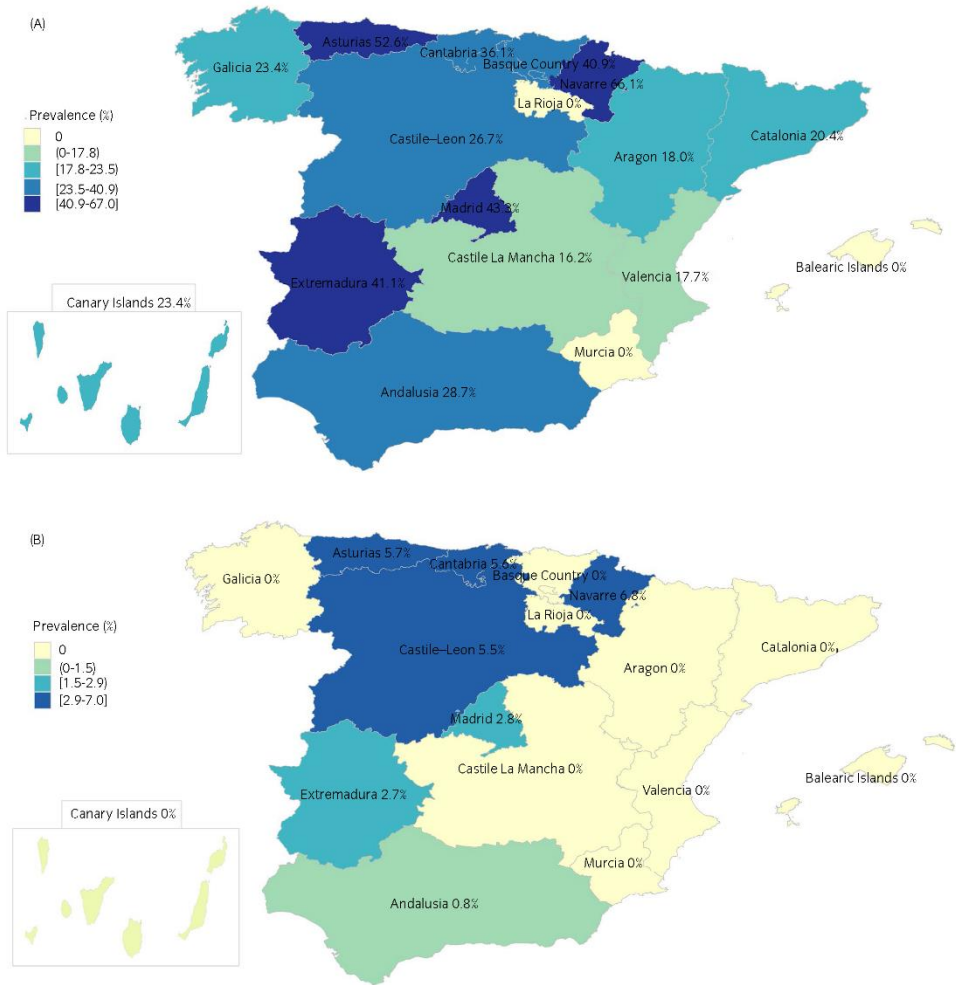


FIGURE 2 True prevalence levels obtained in each autonomous community for *T. equi* (A) and *B. caballi* (B)

Vaccination for tetanus was the only factor significantly associated with a lower seropositivity (OR = 0.51, 95% CI 0.34-0.77).

3.5 | Risk factors for *B. caballi*

Close contact with cows in the same farm was a factor significantly associated with increased odds of being *B. caballi* seropositive (OR = 6.21; 95% 3.22-11.97). However, horses travelling to fairs in the past 6 months were 2.2 times less likely to have antibodies

against *B. caballi* (OR = 0.45; 95% CI 0.27-0.76). There was a significant effect modification of the area in Spain (north/south) where the horse resided on the association between the presence of ticks on the horse and the outcome, meaning that the effect of finding ticks on the horse differed between horses located in northern or southern farms (Table 3); horses with ticks and located in the north would be at greatest risk of being *B. caballi* seropositive (OR = 6.44; 95% 3.65-11.36), whereas horses (with/without ticks) residing in the south of Spain would have the lowest risk of seropositivity (OR = 0.18; 95% 0.05-0.62/ OR = 0.13; 95% 0.06-0.28 respectively).

Variable	<i>T. equi</i> -seropositive	<i>T. equi</i> -seronegative	Odds ratio	95% CI	P-value
Horse's age (continuous) (n = 734)	—	—	1.06	1.03-1.10	<.001
Ticks on the horse in the past 2 years (n = 730)					
No	152	396	Ref.		
Yes	96	86	2.36	1.62-3.43	<.001
Tetanus vaccination (n = 735)					
No	82	70	Ref.		
Yes	171	412	0.51	0.34-0.77	.001
Breed (n = 732)					
Central-European	22	117	Ref.		
Cross-breed	97	99	3.57	2.04-6.25	<.001
Iberian	131	266	2.80	1.66-4.72	<.001

TABLE 2 Output of the final multivariable logistic regression model including only the variables identified as risk factors for *Theileria equi* in horses residing across Spain included in a national EP prevalence survey (n = 740; 254 seropositive and 486 seronegative)

Variable	<i>B. caballi</i> -seropositive	<i>B. caballi</i> -seronegative	Odds ratio	95% CI	P-value
Cows in stud farm (n = 734)					
No	81	579	Ref.		
Yes	33	41	6.21	3.22-11.97	<.001
Fairs attendance in the past 6 months (n = 725)					
No	74	317	Ref.		
Yes	41	293	0.45	0.27-0.76	.003
Location of farm*ticks on the horse in the past 2 years					
Northern areas without ticks	43	172	Ref.		
Northern areas with ticks	60	47	6.44	3.65-11.36	<.001
South areas without ticks	9	324	0.13	0.06-0.28	<.001
South areas with ticks	3	72	0.18	0.05-0.62	.007

TABLE 3 Output of the final multivariable logistic regression model including only the variables identified as risk factors for *Babesia caballi* in horses residing across Spain included in a national EP prevalence survey (n = 740; 116 seropositive and 624 seronegative)

4 | DISCUSSION

The sampling carried out in this study was designed to be representative of the entire horse population in Spain. Serological and molecular tests were carried out to determine the level of (sero)prevalence of EP in apparently healthy horses. Moreover, risk factors associated with EP seropositivity were identified in order to help disease control.

In this study, cELISA test was considered a surveillance tool based on OIE recommendations to certify horses free from EP. The current findings confirmed the endemicity of EP in Spain, showing that almost half of the horses (42.9%) were exposed, similar to results from a study including five communities of Spain.¹² A significantly higher serological exposure to *T. equi* (35.8%) compared with *B. caballi* (15.6%) was detected, in agreement with other EP-endemic European countries such as Greece,²⁶ France²⁷ and Italy.²⁸ Although the level of agreement between cELISA and CFT tests was considerable, a significantly greater number of positive horses were detected by cELISA. This could be due to: 1) the lower estimates of sensitivity

for the CFT (*T. equi*: 80.3%, *B. caballi*: 45.7%) than for the cELISA (*T. equi*: 95.0%, *B. caballi*: 99.9%), already reported by other authors,^{29,30} especially in the case of *B. caballi*³¹; or 2) the CFT primarily detects IgM antibodies, which are mainly produced early in primary infections and tend to disappear by 5 months.^{32,33} Based on this fact, we can assume most horses in our study were chronically infected and/or only showed an IgG-antibody response.²¹

The prevalence of EP in our equine population was 30.3%. From the PCR-positive horses, 79.0% were positive to *T. equi* and/or *B. caballi* CFT and 97.9% were positive to *T. equi* and/or *B. caballi* cELISA, suggesting that the majority of these positive horses could be EP carriers rather than EP acute, primary infections. The significantly higher detection of *T. equi* in EP-positive horses, along with the slight agreement seen between cELISA/CFT and PCR test for *B. caballi*, would suggest a shorter persistence of *B. caballi* (up to 4 years) in comparison with *T. equi* (life-long) after infection as described by other authors.³⁴

Regarding cELISA and PCR results in each Spanish community, horses located in northern and western (Extremadura) regions

would be more likely to be exposed to EP. The growth and the spread of ixodid ticks are favoured by warm temperatures and high relative humidity during rainy season,³⁵ which is very common in the northern communities. Furthermore, Extremadura comprises a large number of rural areas, where horses are usually not housed in stalls but in fields; horses with an outdoor or mixed type of housing are more exposed to tick vectors.³⁵ On the other hand, the lowest exposure was found in central (Castile La Mancha), eastern (Catalonia, Valencia and Murcia) and southern (Andalusia) regions. These results are in agreement with a recent study performed in our laboratory including horses tested prior to exportation, suggesting a higher awareness in the implementation of control measures in order to avoid the exposure to ticks in these regions.⁸¹² Other investigations of EP in Spain showed marked differences in the infection rates among autonomous communities.⁹¹²⁻¹⁴¹⁶ This observation might be related to the sample size, diagnostic tests used, horse activity, management practices and occurrence of competent tick vectors.²⁶³⁷

In accordance with previous studies, increased age and presence of ticks on the horse were associated with a higher seropositivity for *T. equi*.¹³¹⁴ In agreement with other studies, Crossbred and Iberian horses showed the highest risk of being seropositive^{2836j} which could be related to differences in management practices (we speculate crossbred horses may be less well managed due to the fact that they are of lower value and usually not internationally moved for trade) but dissimilarities in breed susceptibility have also been hypothesised.³⁹ Similar to other published studies, vaccination programmes against other diseases were associated with lower EP seroprevalences, probably due to vaccinated horses being subjected to better management conditions, reducing exposure to ticks and, therefore, EP infection.¹³¹⁴

An increase in *B. caballi*-seropositive cases was seen when horses had closer contact with cattle. This result is consistent with previous studies which have confirmed a high risk of infection in horses kept with domestic ruminants since they may share several ticks' species whose presence depends on the abundance of appropriate hosts.²⁷ Attendance at fairs, competitions or other related activities was suggested as a factor that could decrease *B. caballi* seropositivity; horses in competition are usually maintained under strict control and groomed on a daily basis, thus having a lesser risk of tick infestation.³⁹⁴³ Finally, the significant effect modification of the Spanish area (north/south) on the association between presence of ticks on the horse and the outcome suggested that horses with ticks and located in the north would be more likely to be seropositive than those (with/without ticks) resided in the south. The possible reason is the higher abundance and burden of infection of northern tick vectors, which could be attributed to a more suitable vector habitat, as these regions tend to have a greater humidity and forest land.²⁸⁴¹

This is the first report of a nationwide investigation on EP in Spain confirming *T. equi* and *B. caballi* are subclinically present throughout the country. Seroprevalence varied depending on the geographic area within Spain but seems to be greater in the northern regions. The comparison between CFT and cELISA tests reaffirmed

that the latter is the best choice to monitor the exposure to EP in horses. Farmers, equine owners and veterinary practitioners should consider that a high number of asymptomatic horses could have a carrier status and may act as disseminators of this disease. Age, presence of ticks, breed, contact with cattle and geographical location were factors linked to EP seropositivity, whereas tetanus vaccination and fairs/competitions attendance could be factors associated with lower EP infection. Further studies with the aim to investigate the influence of environmental factors on ticks' ecology and their distribution in Spain would aid in the implementation of measures for the prevention and control of EP in this country.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to J. Hernández from SIC department at the VISAVET Health Surveillance Centre, for their help in the editing of the questionnaire and figures included in the manuscript. We are also grateful to all the veterinary surgeons and farm owners who participated in this study.

CONFLICT OF INTERESTS

No competing interests have been declared.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

E. Camino contributed to the design of the study, as well as the sampling, performance of analyses, acquisition of data, analysis and interpretation of results, drafting the article and final revision. A. Buendia contributed to the design of a part of the study, as well as performance of real-time PCR on the samples from the study, revision and final approval of the article. A. Dorrego contributed to the design of a part of the study, as well as performance of cELISA tests on the samples from the study, revision and final approval of the article. P. Pozo contributed to the analysis of results, as well as drafting a part of the article, revision and final approval of the article. L. de Juan contributed to the design of the study, as well as the analysis of results, revision and final approval of the article. L. Domínguez contributed to the design of the study, as well as the analysis of results, revision and final approval of the article. F. Cruz-Lopez contributed to the conception and design of the study, as well as the analysis and interpretation of results, drafting and revising the article, and providing the final approval of the article.

ETHICAL ANIMAL RESEARCH

The whole sampling related to this study underwent the Ethical Committee of the Universidad Complutense de Madrid and, since no risk procedures or treatments were applied to the horses sampled, the study was deemed approved.

OWNER INFORMED CONSENT

The owners of the horses included in the study received an information sheet with all the information regarding the study and they signed an informed consent for the sampling and acquisition of data, which would also allow the samples to be used in further studies.

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/evj.13348>.

DATA ACCESSIBILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

ORCID

Eliazar Camino  <https://orcid.org/0000-0002-4507-034X>

Fatima Cruz-Lopez  <https://orcid.org/0000-0002-1142-3944>

REFERENCES

- Mehlhorn H, Schein E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. *Parasitol Res*. 1998;84:467-75.
- De Waal DT. Equine piroplasmosis - a review. *Brit Vet J*. 1992;148:6-14.
- Scoles GA, Ueti MW. Vector ecology of equine piroplasmosis. *Annu Rev Entomol*. 2015;60:561-80.
- Nagore D, García-Sanmartín J, García-Pérez AL, Juste RA, Hurtado A. Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: epidemiological survey and phylogenetic analysis. *Vet Parasitol*. 2004;123:41-54.
- Rothschild CM. Equine piroplasmosis. *J Equine Vet Sci*. 2013;33:497-508.
- Onyiche TE, Suganuma K, Igarashi I, Yokoyama N, Xuan X, Thekisoe O. A review on equine piroplasmosis: epidemiology, vector ecology, risk factors, host immunity, diagnosis and control. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(10):1736.
- Wise LN, Peizel-McCluskey AM, Mealey RH, Knowles DP. Equine piroplasmosis. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2014;30:677-93.
- Camino E, Pozo P, Dorrego A, Carvajal KA, Buendía A, Gonzalez S, et al. Importance of equine piroplasmosis antibody presence in Spanish horses prior to export. *Ticks Tick Borne Dis*. 2019;10:1329.
- Camacho AT, Guitián FJ, Pallas E, Gestal JJ, Olmeda AS, Habela MA, et al. *Theileria* (*Babesia*) *equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain. *Trop Anim Health Prod*. 2005;37:293-302.
- Cordero del Campillo M, Ordaz-Alvarez M, Rojo-Vazquez FA, Escudero-Díez A. On equine babesiosis in Spain. *Revista Iberica de Parasitología*. 1974;34:305-15.
- Habela M, Reina D, Nieto C, Verdugo SG, Navarrete L. Epidemiología de la babesiosis equina en Extremadura: estudio preliminar. *Medicina Veterinaria*. 1989;6:31-9.
- Montes Cortes MG, Fernández-García JL, Habela Martínez-Estellez MA. Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Spain. *Parasite*. 2017;24:14.
- Camino E, de la Cruz ML, Domínguez L, Carvajal KA, Fores P, de Juan L, et al. Epidemiological situation of the exposure to agents causing equine piroplasmosis in Spanish purebred horses in Spain: Seroprevalence and associated risk factors. *J Equine Vet Sci*. 2018;67:81-6.
- García-Bocanegra I, Arenas-Montes A, Hernández E, Adaszek L, Carbonero A, Almería S, et al. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. *Vet J*. 2013;195:172-8.
- Montes Cortes MG, Fernández-García JL, Habela Martínez-Estellez MA. A multistep PCR for detection of the equine piroplasmids *Babesia caballi* and *Theileria equi*. *Ticks Tick Borne Dis*. 2019;10:305-13.
- Adaszek L, García-Bocanegra I, Arenas-Montes A, Carbonero A, Arenas A, Winiarczyk S. Identification of piroplasms isolated from asymptomatic equine species from southern Spain. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2012;125:509-12.
- Thrusfield M. *Veterinary epidemiology*, 2nd edn. Oxford, UK: Blackwell Science; 2005.
- Deloitte. Estudio del Impacto del Sector Ecuéstre en España. Real Federación Hípica Española. 2013.
- Camino E, Carvajal K, Lozano F, Viñolo C, Alende T, Domínguez L, Cruz-Lopez F. (2016) Estudio de seroprevalencia de piroplasmosis equina en España en muestras previas a la exportación. Asociación de Especialistas en Diagnóstico Laboratorial Veterinario (AVEDILA).
- VMRD. Equine piroplasmosis. *Veterinary Diagnostic Test Kits and Reagents*. 2017;3-4.
- OIE. Equine Piroplasmosis. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Chapter 3.5.8. 2018.
- Camino E, Dorrego A, Carvajal KA, Buendía-Andrés A, de Juan L, Domínguez L, et al. Serological, molecular and hematological diagnosis in horses with clinical suspicion of equine piroplasmosis: Pooling strengths. *Vet Parasitol*. 2019;275:108928.
- NCBI. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). 2020.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33:159-74.
- Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied Logistic Regression*, 2nd edn. New York, USA: Wiley Interscience Press; 2000. p. 143-88.
- Kouam MK, Kantzoura V, Gajadhar AA, Theis JH, Papadopoulos E, Theodoropoulos G. Seroprevalence of equine piroplasms and host-related factors associated with infection in Greece. *Vet Parasitol*. 2010;169:273-8.
- Guidi E, Pradier S, Lebert I, Leblond A. Piroplasmosis in an endemic area: analysis of the risk factors and their implications in the control of *Theileriosis* and *Babesiosis* in horses. *Parasitol Res*. 2015;114:71-83.
- Bartolome Del Pino LE, Nardini R, Veneziano V, Iacoponi F, Cersini A, Autorino GL, et al. *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Central-Southern Italy: Sero-molecular survey and associated risk factors. *Ticks Tick Borne Dis*. 2016;7:462-9.
- Ogunremi O, Georgiadis MP, Halbert G, Benjamin J, Pfister K, Lopez-Rebollar L. Validation of the indirect fluorescent antibody and the complement fixation tests for the diagnosis of *Theileria equi*. *Vet Parasitol*. 2007;148:102-8.
- Tenter AM, Otte MJ, Gonzalez CA, Abuabara Y. Prevalence of piroplasmosis in equines in the Colombian province of Córdoba. *Trop Anim Health Prod*. 1988;20:93-8.
- Ogunremi O, Halbert G, Mainar-Jaime R, Benjamin J, Pfister K, Lopez-Rebollar L, et al. Accuracy of an indirect fluorescent-antibody test and of a complement-fixation test for the diagnosis of *Babesia caballi* in field samples from horses. *Prev Vet Med*. 2008;83:41-51.
- Bose R, Jorgensen WK, Dalglish RJ, Friedhoff KT, de Vos AJ. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet Parasitol*. 1995;57:61-74.
- Tenter AM, Friedhoff KT. Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. *Vet Parasitol*. 1986;20:49-61.
- Bruning A. Equine piroplasmosis: an update on diagnosis, treatment and prevention. *Br Vet J*. 1996;152:139-51.
- Khajuria V, Godara R, Yadav A, Katoch R. Prevalence of ixodid ticks in dairy animals of Jammu region. *J Parasit Dis*. 2015;39:418-21.
- Ribeiro AJ, Cardoso L, Maia JM, Coutinho T, Cotovio M. Prevalence of *Theileria equi*, *Babesia caballi*, and *Anaplasma phagocytophilum* in horses from the north of Portugal. *Parasitol Res*. 2013;112:2611-7.
- Salim BO, Hassan SM, Bakheit MA, Alhassan A, Igarashi I, Karanis P, et al. Diagnosis of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Sudan using ELISA and PCR. *Parasitol Res*. 2008;103:1145-50.
- Aharanson-Raz K, Rapoport A, Hawari IM, Lensky IM, Berlin D, Zivotofsky D, et al. Novel description of force of infection and risk factors associated with *Theileria equi* in horses in Israel and in The Palestinian Authority. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014;5:366-72.

39. Steinman A, Zimmerman T, Klement E, Lensky IM, Berlin D, Gottlieb Y, et al. Demographic and environmental risk factors for infection by *Theileria equi* in 590 horses in Israel. *Vet Parasitol.* 2012;187:558–62.
40. Sumbria D, Singla LD, Kumar S, Sharma A, Dahiya RK, Setia R. Spatial distribution, risk factors and haemato-biochemical alterations associated with *Theileria equi* infected equids of Punjab (India) diagnosed by indirect ELISA and nested PCR. *Acta Trop.* 2016;155:104–12.
41. Vanwambeke SO, Sumilo D, Bormane A, Lambin EF, Randolph SE. Landscape predictors of tick-borne encephalitis in Latvia: land cover, land use, and land ownership. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010;10:497–506.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Camino E, Buendía A, Dorrego A, et al. Sero-molecular survey and risk factors of equine piroplasmosis in horses in Spain. *Equine Vet J.* 2020;00:1–9. <https://doi.org/10.1111/evj.13348>

Supplementary Item 1:



Questionnaire
VISAVET Health Surveillance Centre | VISAVET/CC-BY-NC-ND/4.0

Study of prevention and control measures for Equine Piroplasmosis in Spanish equine farms

Name: _____
NIF: _____
Email: _____

Sample Data

1. Identification* _____
2. City name* _____
3. Farm name* _____
4. Date and time sampled* _____

General information related to the horse

5. Breed* _____
6. Age* _____
7. Gender* Stallion/Mare/Gelding
8. Aptitude* Breeding / Leisure / Sport / Other Please specify _____
9. In the last 2 years, has any tick been observed on the horse? Yes ☐ No ☐
10. In the last 2 years, has the horse presented some of these clinical signs? Fever ☐ Pale mucous membranes ☐ Poor performance ☐
11. In the last 2 years, has the horse been diagnosed with piroplasmosis or been suspicious of suffering from it? Yes ☐ No ☐
12. Where is the horse housed? Indoor ☐ Outdoor ☐ Mixed habitat ☐
13. Is the horse brushed/checked daily? Yes ☐ No ☐
14. Is a routine external deworming applied to the horse? Yes ☐ No ☐
Please specify how many times per year is the horse wormed and which product/s is/are used

15. Is a routine internal deworming applied to the horse (minimum 2 times per year)? Yes ☐ No ☐
16. Is a vaccination protocol applied to the horse every year? Yes ☐ No ☐
Tetanus ☐ Equine Influenza ☐ Equine Herpesvirus-1/4 ☐ West Nile Virus ☐
17. May the horse have direct contact with other equidae (horses, donkeys, mules)? Yes ☐ No ☐
18. May the horse have direct contact with wild animals (deer)? Yes ☐ No ☐
19. In the last 6 months, has the horse participated in fairs, competitions or other related activities? Yes ☐ No ☐

General information related to the farm

20. Which is the total size of the farm (area in ha)? _____
21. Number of horses currently residing in the farm* _____
22. Which activities are carried out in the farm? Breeding ☐ Schooling ☐ Livery ☐ Sport ☐ Hacking ☐ Other ☐
23. Are animals residing in the farm, other than horses? Cows ☐ Sheep ☐ Goats ☐ Dogs ☐ Other _____
24. Have there been former cases of equine piroplasmosis on other horses in the farm? Yes ☐ No ☐
Please specify the number of infected horses

25. Are there or have there been ticks in the farm? Yes ☐ No ☐
26. In the farm, is there a disinfection scheme in place? Yes ☐ No ☐
Please specify which parts of the farm are disinfected

27. In the farm, is there a specific scheme in order to eliminate insects? Yes ☐ No ☐
Please specify which parts of the farm are treated against insects

28. In the farm, is there a specific scheme in order to eliminate rodents? Yes ☐ No ☐
Please specify which parts of the farm are treated against rodents

29. In the past 6 months, have horses from other farms entered the farm? Yes ☐ No ☐

Copyright © 2020 VISAVET. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (U.C.M.) | Reservados todos los derechos.

Supplementary Item 2: List of variables (n = 39) tested for inclusion in the multivariable logistic regression model with their frequencies.

Variable	Category	Frequencies (%)
Date sampled (n=740)	Spring - Summer	424 (57.3)
	Autumn - Winter	316 (42.7)
Breed (n=732)	Central-European	139 (19.0)
	Cross-breed	196 (26.8)
	Iberian	397 (54.2)
Age (n=734)	Continuous	
Age (n=734)	1 - 6 years	291 (39.6)
	7 - 15 years	367 (50.0)
	15 - 32 years	76 (10.4)
Sex (n=740)	Male	446 (60.3)
	Female	294 (39.7)
Aptitude (n=725)	Breeding	183 (25.2)
	Sport	336 (46.3)
	Leisure	206 (28.4)
Housing (n =740)	Indoor	326 (44.1)
	Mixed habitat	276 (37.3)
	Outdoor	138 (18.6)
Ticks on the horse in the past 2 years (n=730)	No	548 (75.1)
	Yes	182 (24.9)
Daily brushing (n=736)	No	210 (28.5)
	Yes	526 (71.5)

Routine external deworming (n=732)	No	487 (66.5)
	Yes	245 (33.5)
Vaccination (n=736)	No	149 (20.2)
	Yes	587 (79.8)
Influenza vaccination (n=735)	No	152 (20.7)
	Yes	583 (79.3)
Tetanus vaccination (n=735)	No	152 (20.7)
	Yes	583 (79.3)
EHV-1/-4 vaccination (n=735)	No	635 (86.4)
	Yes	100 (13.6)
WNV vaccination (n=735)	No	706 (96.1)
	Yes	29 (3.9)
Anaemia (n=740)	No	654 (88.4)
	Yes	86 (11.6)
Total bilirubin levels (n=709)	≤ 2.5 mg/dl	660 (93.1)
	> 2.5 mg/dl	49 (6.9)
Variable	Category	Frequencies (%)
Possible contact with wild animals (n=735)	No	599 (81.5)
	Yes	136 (18.5)
Fairs attendance in the past 6 months (n=725)	No	391 (53.9)
	Yes	334 (46.1)
Location (n=740)	North	332 (44.9)
	South	408 (55.1)
Total area of the farm (n=710)	Continuous	
Number of horses in farm (n=721)	≤ 30 horses	400 (55.5)
	> 30 horses	321 (44.5)
Breeding activities in the farm (n=708)	No	393 (55.5)
	Yes	315 (44.5)

Schooling activities in the farm (n=708)	No	475 (67.1)
	Yes	233 (32.9)
Liveries activities in the farm (n=708)	No	415 (58.6)
	Yes	293 (41.4)
Sport activities in the farm (n=708)	No	332 (46.9)
	Yes	376 (53.1)
Tour activities in the farm (n=708)	No	639 (90.3)
	Yes	69 (9.7)
Other activities in the farm (n=708)	No	589 (83.2)
	Yes	119 (16.8)
Cows in farm (n=734)	No	660 (89.9)
	Yes	74 (10.1)
Goats in farm (n=734)	No	578 (78.7)
	Yes	156 (21.3)
Sheeps in farm (n=734)	No	620 (84.5)
	Yes	114 (15.5)
Dogs in farm (n=734)	No	236 (32.2)
	Yes	498 (67.8)
Cats in farm (n=732)	No	640 (87.4)
	Yes	92 (12.6)
Birds in farm (n=732)	No	661 (90.3)
	Yes	71 (9.7)
Ticks in farm (n=735)	No	277 (37.7)
	Yes	458 (62.3)
Disinfection regime in the farm (n=735)	No	352 (47.9)
	Yes	383 (52.1)
Insect control in the farm (n=737)	No	421 (57.1)
	Yes	316 (42.9)

Rodents control in the farm (n=740)	No	394 (53.2)
	Yes	346 (46.8)
Acquired horses in the past 6 months (n=706)	No	164 (23.2)
	Yes	542 (76.8)

4.3 Estudios complementarios

4.3.1 Artículo 3: Diagnóstico serológico, molecular y hematológico en caballos con sospecha clínica de piroplasmosis equina: aunando fuerzas

Referencia publicación: Camino, E., Dorrego, A., Carvajal, K.A., Buendia-Andres, A., de Juan, L., Dominguez, L., Cruz-Lopez, F., 2019. *Serological, molecular and hematological diagnosis in horses with clinical suspicion of equine piroplasmosis: Pooling strengths. Vet Parasitol* 275, 108928.

Este artículo fue publicado en el año 2019 en la revista "Veterinary Parasitology" [factor de impacto: 2.157, cuartil: Q1, ranking: 24/142 (Veterinary Sciences)].

Resumen:

La piroplasmosis equina es una enfermedad parasitaria de los animales domésticos y salvajes pertenecientes a la familia *Equidae*, y causada por dos hemoprotozoos (*T. equi* y *B. caballi*) transmitidos por garrapatas ixódidas, las cuales están presentes en la mayoría de las regiones (sub)tropicales y templadas del mundo. La PE se puede manifestar de forma hiperaguda, aguda, subaguda o crónica; sin embargo, el diagnóstico basado en los signos clínicos (fiebre, anemia, ictericia, hemoglobinuria, edema distal, pérdida de peso y disminución del rendimiento) es complicado debido a que éstos no son patognomónicos de esta enfermedad. Este hecho ha motivado el desarrollo tanto de métodos de diagnóstico directos como indirectos con el fin de demostrar infección o contacto con dichos parásitos, respectivamente.

A pesar de la información disponible relativa al diagnóstico de la PE, en países endémicos, como España, el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad se lleva normalmente a cabo sin una confirmación por el laboratorio de la presencia de estos parásitos. El objetivo de este estudio fue describir la presencia de cambios hematológicos y bioquímicos en caballos

con sospecha clínica de PE, y presentar la técnica más apropiada para el diagnóstico de la PE en estos casos. En este estudio se incluyeron muestras de sangre procedentes de 140 caballos de diferentes razas que mostraban signos clínicos comunes de PE. En dichas muestras, se evidenció la presencia de ambos protozoos en el interior de los eritrocitos mediante la visualización de frotis sanguíneos, y los resultados de su análisis serológico (cELISA), molecular (PCR a tiempo real de tipo *multiplex*), hematológico (GR, Hgb, Htc, GB y plaquetas) y bioquímico (BT y BD) se compararon entre sí utilizando distintas pruebas estadísticas.

El análisis microscópico de los frotis reveló la presencia de estos parásitos en solo un 9.3% de los caballos estudiados, mientras que la positividad por cELISA y por PCR fue del 50.7% (*T. equi*: 44.3%; *B. caballi*: 16.4%) y del 42.9% (*T. equi*: 39.3%; *B. caballi*: 5.7%), respectivamente. El número de individuos positivos a *B. caballi* por cELISA resultó ser significativamente mayor que el obtenido por PCR, siendo el valor de concordancia (k) entre dichas técnicas mayor para *T. equi* ($k = 0.575$) que para *B. caballi* ($k = 0.401$). Estos resultados podrían reafirmar la mayor capacidad del organismo para eliminar *B. caballi*, pudiendo *T. equi* permanecer en el individuo de por vida. Por otro lado, la mayoría de los caballos analizados mostraron valores disminuidos de Hgb (48.6%) y Htc (45.7%), y aumentados de BT (35.0%), no existiendo para este último parámetro diferencias estadísticamente significativas entre caballos positivos y negativos a cELISA o PCR. Aunque la mayoría de los autores asocian una mayor patogenicidad a *T. equi*, nuestros resultados identificaron una anemia más severa en caballos parasitados por *B. caballi*. Los caballos positivos a *B. caballi* mostraron valores significativamente más bajos de GR [$p = 0.004$ (PCR) y $p < 0.001$ (cELISA)], Hgb [$p < 0.001$ (PCR) y $p = 0.001$ (cELISA)], Htc [$p = 0.001$ (PCR) y $p = 0.007$ (cELISA)] y plaquetas [$p < 0.001$ (PCR y cELISA)] que los *B. caballi*-negativos, mientras que los positivos a *T. equi* presentaron valores de GB significativamente más altos [$p = 0.001$ (PCR y cELISA)].

Los resultados derivados de este estudio confirman un mayor número de infecciones debidas a *T. equi* en España. Aunque en caballos con sospecha clínica de PE el hemograma puede servir de guía para el diagnóstico, la PCR sería la técnica de elección para la confirmación de la infección.



Research paper

Serological, molecular and hematological diagnosis in horses with clinical suspicion of equine piroplasmosis: Pooling strengths



Eliazar Camino^{a,b}, Abel Dorrego^a, Kelly Alejandra Carvajal^a, Aranzazu Buendia-Andres^a,
Lucia de Juan^{a,b}, Lucas Dominguez^{a,b}, Fatima Cruz-Lopez^{a,*}

^a VISA-VET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense, Madrid, Spain

^b Animal Health Department, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Equine piroplasmosis

Clinical signs

Hematology

Real-time PCR

Competitive ELISA

ABSTRACT

Equine piroplasmosis (EP) is a tick-borne protozoan disease caused by *Theileria equi* and/or *Babesia caballi*. Clinical signs (fever, pale mucosal membranes, jaundice), anemia and hyperbilirubinemia have been associated with the disease. EP is widespread, has a significant economic impact on the equine industry and remains endemic in Spain. This study was carried out with samples belonging to 140 horses residing in Spain and showing common clinical signs of EP. A blood smear microscopic examination and a comparison between the different results obtained by competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (cELISA), real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) and hematological and biochemical (direct and total bilirubin) screening were conducted. EP positivity rates by cELISA and PCR were 50.7% and 42.9%, respectively, whereas only 9% of the horses were positive in the microscopic analysis. A significantly higher number of *B. caballi*-positive horses were detected by cELISA than PCR, and Kappa value was higher for *T. equi* ($k = 0.575$) than for *B. caballi* ($k = 0.401$). For the first time, an association between a high ELISA inhibition percentage (IP) and a positive PCR result for *B. caballi* was determined. Although most authors have described *T. equi* as more pathogenic than *B. caballi*, we found that horses parasitized by *B. caballi* showed a more severe hemolytic anemia, whereas *T. equi* infections were mostly associated with leukocytosis. The hemogram and clinical chemistry could guide the veterinary surgeon towards the diagnosis of *T. equi* or *B. caballi* since horses showed a significant leukocytosis or anemia and hyperbilirubinemia, respectively; however PCR would be the test of choice in order to confirm the diagnosis. Information about the importance of a correct diagnosis of EP using a combination of techniques is essential in order to allow the early detection of cases and prevent the spread of the disease, as well as to avoid the common practice of treating horses without a laboratory diagnosis.

1. Introduction

Wild and domestic animals belonging to the *Equidae* family (horses, donkeys, mules and zebras) are affected by equine piroplasmosis, a tick-borne protozoan disease (Mehlhorn and Schein, 1998). Two intra-erythrocytic hemoprotozoans (*T. equi* and *B. caballi*) are the causal agents of this disease, which is found in most tropical, sub-tropical and temperate areas of the world and is transmitted by Ixodid ticks, including the genera *Dermacentor*, *Hyalomma*, and *Rhipicephalus* (Dewaal, 1992; Homer et al., 2000). Mixed *T. equi* and *B. caballi* infections are known to happen when a common vector is present (Scoles and Ueti, 2015). Iatrogenic transmission by transfer of blood or through contaminated needles can also occur (Short et al., 2012). Both parasites may cause hyperacute, acute, subacute or chronic disease (Rothschild, 2013).

Infected animals can recover although they may become carriers for several years (*B. caballi*) or life-long (*T. equi*), behaving as reservoirs for ticks (Knowles, 1996). EP is a disease causing major restrictions and economic losses in the international movement of horses (Friedhoff et al., 1990; Wise et al., 2013). Diagnosis of EP is difficult since the most common clinical findings (transient fever exceeding 40 °C, jaundice, petechial haemorrhages, hemoglobinuria, bilirubinuria and edema of the distal limbs) are variable and nonspecific in any of the clinical infections (peracute, acute, subacute and chronic) (Maurer, 1962). Abortions, inappetence, loss of body condition, poor performance and even death can also be observed in horses (Taylor et al., 1969; Zobba et al., 2008). Horses present hemolytic anemia as well as high bilirubin, and may show leukocytosis and hyperproteinemia (Kumar et al., 2002). Direct methods (peripheral blood smear examination, *in vitro* cultures

* Corresponding author.

E-mail address: fatimacr@ucm.es (F. Cruz-Lopez).

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108928>

Received 20 June 2019; Received in revised form 18 September 2019; Accepted 20 September 2019
0304-4017/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

and molecular tools) and indirect methods [complement fixation test (CFT), indirect fluorescent antibody test (IFAT) and competitive ELISA] have been developed to demonstrate infection or contact with the parasites (García-Bocanegra et al., 2013; Holman et al., 1993).

Despite the information regarding hematological, molecular and serological approaches to the diagnosis of *T. equi* and *B. caballi* infections (Moretti et al., 2010; Ybanez et al., 2018), veterinary surgeons in endemic areas (such as Spain) often base the diagnosis and treatment of EP on clinical and epidemiological criteria, without having a confirmation of the presence of these parasites in the horse (Coulthous et al., 2019; Leblond, 2019). The aims of this study were (1) to describe the presence of hematological and biochemical (total and direct bilirubin) changes in horses with clinical suspicion of EP, (2) to evaluate the comparative performance of different diagnostic tests in these horses, and (3) to present the most appropriate technique for the diagnosis of EP in these cases, which will result in a faster and more accurate resolution.

2. Materials and methods

A total of 140 horses of different breeds residing in different areas throughout Spain were included in the study. After a routine physical examination carried out by a veterinary surgeon, blood samples were collected from the jugular vein of horses that presented at least three of the most common clinical signs of EP: pyrexia (rectal temperature of 38.5 °C or higher), jaundice and pale mucous membranes. Blood samples were placed into two sterile tubes (with and without EDTA anticoagulant) and submitted on ice to the Equine Health Surveillance Unit (VISAVET Centre) between February 2016 and April 2019. For each horse included in the study, the tube without anticoagulant was centrifuged, and serum was separated and stored at -20 °C until biochemical and serological tests were carried out. The blood with EDTA was used for the hematological screening and the remaining blood was stored at -80 °C until DNA extraction.

2.1. Hematological and biochemical analysis

Hematological parameters [total red blood cell (RBC), packed cell volume (PCV), hemoglobin concentration (Hb), white blood cell (WBC) and platelet count] were determined by using an automatic counter system (Urit 2900 Vet Plus TS, URIT Medical Electronic Group Co, LTD, Guilin, China), whereas biochemical analyses (TB: total bilirubin, DB: direct bilirubin) were performed by liquid chemistry (DILABO, Ciudad Real, Spain) by using an automatic photometer (TECOM TC220, TECOM, Jiangxi, China) and the reference intervals for horses from a population of 120 healthy horses residing in Spain using the same reagents and photometer (data not published from the VISAVET Centre, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain). The RBC, PCV and Hb were used as indicators of anemia using the reference intervals from the automatic counter system.

2.2. Blood smear microscopic evaluation

Thin EDTA blood smears were prepared, stained with Diff Quick panoptic method and observed at 40x and under oil immersion to detect the presence of intra-erythrocytic piroplasms.

2.3. Competitive ELISA

Serum samples were thawed and used to detect equine IgG-specific antibodies against *T. equi* and *B. caballi* using two commercial cELISA kits (VMRD Inc., Pullman, WA, USA), which presented a sensitivity of 95.0% (*T. equi*) and 100% (*B. caballi*) and a specificity of 99.5% (*T. equi*) and 100% (*B. caballi*) (data derived from VMRD catalog 2017) (VMRD, 2017). Assays were performed according to the manufacturer's instructions. Results were calculated from the optical densities

measures at 620 nm and expressed as IP. Sera were classified as positive (IP ≥ 40%) or negative (IP < 40%).

2.4. DNA extraction

Total genomic DNA was extracted from 200 µl EDTA blood using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Spain), according to the manufacturer's protocol. Extracted DNA was preserved at -40 °C until multiplex real-time PCR was carried out.

2.5. Multiplex real-time PCR

A multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of both hemoprotozoan parasites from horse blood samples was adapted from a previously published assay for the detection of *T. equi* (Kim et al., 2008) and *B. caballi* (Bhoola et al., 2010) using primers and TaqMan probes to specifically amplify the V4 hypervariable region of the 18S rRNA gene of *T. equi* and *B. caballi* and with a detection limit of 3.0×10^{-4} % PE (parasitized erythrocytes) for *T. equi* and 2.0×10^{-3} % PE for *B. caballi*.

The PCR mix contained a total reaction volume of 25 µl comprising 5x TaqMan QuantiFast Pathogen PCR master mix (Qiagen, Spain), 0.4 µM of each forward and reverse primer for both *B. caballi* and *T. equi* (Be.18SF, Be.18SR, Bc.18SF402 and Bc.18SR496), 0.2 µM of Be.18SP probe, 0.4 µM of Bc.18SP probe, and 5 µl of target DNA (Bhoola et al., 2010; Kim et al., 2008). The 5'-end of Be.18SP probe was labeled with FAM reporter dye and the 3'-end with BHQ1 quencher dye. Bc.18SP was labeled as follows: 5'-TexasRed, 3'-BHQ2. An internal DNA control template, plus an internal control primer/probe set (Qiagen, Spain) were also incorporated in the reaction. Positive controls (*T. equi* and *B. caballi* DNAs obtained in our laboratory from the blood of two horses with acute disease which tested positive to the PCR and were confirmed by sequencing the 18S rRNA gene) as well as a negative extraction control and a negative PCR control (ultrapure sterilized water) were included in the PCR assay.

Real-time PCR reactions were performed using a CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Cycling conditions used for either *T. equi* and *B. caballi* amplification were the following: initial denaturation cycle at 95 °C for 5 min, followed by 45 cycles of 1 s at 95 °C and 60 s at 55 °C. The collected fluorescence data was analyzed using the Bio-Rad CFX Manager (Version 3.1; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

2.6. Statistical analysis

Seropositivity rates by cELISA and PCR for both *T. equi* and *B. caballi* were analyzed using Chi square test (χ^2). Furthermore, in order to determine the level of agreement between the different results obtained by molecular and serological tests for both parasites, Kappa coefficient (k) was calculated and assigned to the corresponding ranges (Landis and Koch, 1977) (Supplementary data).

The statistical association between the different variables was analyzed using Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests for continuous numerical variables with a non-normal distribution and by t-Student and ANOVA tests for those whose distribution was normal. Kolmogorov-Smirnov test was used to check the normality of the variables. The analyses were performed in the following combinations: (A) PCR result (positive/negative) vs cELISA IP; (B) PCR result (positive/negative) vs hematological and biochemical quantitative values; and (C) cELISA result (positive/negative) vs hematological and biochemical results. Besides, the strength and direction of the association between IP results and hematological and biochemical values was measured by calculating the Pearson (r) and Spearman's correlation coefficient (p) for normally and non-normally distributed variables, respectively. All evaluations were conducted for both parasites using the software IBM SPSS Statistics version 20. Differences were considered to be statistically significant with a p value < 0.05.

3. Results

The horses included in the survey showed the following mean values for hematological and biochemical parameters: RBC ($6.7 \pm 1.4 \times 10^6/\mu\text{L}$), Hb concentration ($10.9 \pm 2.2 \text{ g/dL}$), PCV ($31.0 \pm 6.4\%$), WBC ($8.5 \pm 2.9 \times 10^3/\mu\text{L}$), platelet count ($129 \pm 60 \times 10^3/\mu\text{L}$), TB ($2.7 \pm 2.2 \text{ mg/dL}$) and DB ($0.34 \pm 0.44 \text{ mg/dL}$). Of the 140 horses, nineteen (13.6%), sixty-eight (48.6%) and sixty-four (45.7%) had decreased values of RBC, Hb and PCV, respectively. Furthermore, an increase in the value of TB and DB was present in 35.0% (49/140) and 4.3% (6/140) horses, respectively.

The examination of thin blood smears revealed one or two basophilic pear-shaped intraerythrocyte parasites with a length of 2–5 μm (*B. caballi*) or smaller merozoites with a pyriform, round or ovoid shape, some of which were forming the “maltese cross” (*T. equi*) (Malekifard et al., 2014) in only 9.3% (13/140) of the studied horses.

Competitive ELISA tests revealed that 71 of the 140 horses (50.7%) included in the survey showed antibodies to EP. The seropositivity rates for *T. equi* and *B. caballi* in these animals were 44.3% (62/140) and 16.4% (23/140), respectively. Furthermore, 14 (10.0%) horses tested seropositive for both piroplasmids. Multiplex real-time PCR based on the 18S rRNA gene showed that 60 of the 140 animals sampled (42.9%) were positive for EP. Of these, 55 horses (39.3%) were positive for *T. equi* and 8 (5.7%) for *B. caballi*. Co-infection with both hemoparasites was found in only 3 (2.1%) horses. Statistical analysis of these data by χ^2 test demonstrated that the percentage of qPCR-positives and the seropositives for *T. equi* were significantly higher (p value < 0.001) than for *B. caballi*. A statistically significant difference (p value < 0.001) in the diagnosis of *B. caballi* infections between PCR and cELISA was showed. However, no significant differences (p value = 0.265) were observed in the case of *T. equi*.

Overall, concordance value between the molecular and serological tests for the diagnostic of EP showed a moderate strength of agreement (kappa value = 0.587) (Landis and Koch, 1977). Kappa statistic between both diagnostic techniques (PCR and cELISA) was higher for the detection of *T. equi* infections ($k = 0.575$) than for *B. caballi* ($k = 0.401$), being classified in the range of moderate and fair strength of association, respectively (Landis and Koch, 1977).

Results revealed the existence of a statistically significant association between PCR results and cELISA IP values for both *T. equi* (p value < 0.001) and *B. caballi* (p value = 0.001) by using the Mann-Whitney U test. Real-time PCR positive horses showed a significantly higher cELISA IP (Fig. 1).

Regarding the comparison between the positive/negative EP PCR and positive/negative EP cELISA results with hematological and biochemical values, statistically significant differences were found for

several parameters; RBC (p value = 0.020) and Hb (p value = 0.042) were significantly lower in EP PCR positive horses, while WBC were significantly higher in EP positive horses, using both PCR (p value = 0.002) and cELISA (p value = 0.001) (Table 1).

Horses with a positive PCR for *T. equi* presented significantly higher WBC counts than horses with a negative PCR result (p value = 0.001). This finding was also obtained when using the cELISA (p value = 0.001) (Table 2). Horses with a positive PCR for *B. caballi* had significantly lower values of RBC (p value = 0.004), Hb (p value < 0.001), PCV (p value = 0.001) and platelet count (p value < 0.001). When using the *B. caballi* cELISA test, the same significant associations were also revealed for RBC (p value < 0.001), Hb (p value = 0.001), PCV (p value = 0.007) and platelet count (p value < 0.001) (Table 3). The differences were not significant for any of the serum biochemical parameters (TB and DB) between positive and negative animals to *T. equi* and *B. caballi* when using PCR or cELISA.

Statistical analysis (Pearson and Spearman coefficients) carried out to evaluate the relationship between the hematological/biochemical values and cELISA IP showed that, for *T. equi*, there was a statistically significant positive correlation with WBC count ($p = 0.239$; p value = 0.004). In the case of *B. caballi*, a statistically significant negative correlation was showed with the following hematological parameters: RBC ($r = -0.383$, p value < 0.001), Hb ($r = -0.264$, p value = 0.002), PCV ($r = -0.293$, p value < 0.001) and platelet count ($r = -0.226$, p value = 0.007); a milder proportional direct correlation was observed with the total bilirubin value ($r = 0.138$, p value = 0.104).

4. Discussion

This study presents the serological, molecular, hematological and biochemical results obtained from 140 horses with a clinical suspicion of EP residing in Spain. The clinical signs shown by all these horses (pyrexia, pale mucous membranes and icterus) have been described in other studies for horses with acute EP (Hailat et al., 1997; Ionita et al., 2018). Our study reported that only 42.9% of horses with clinical signs suggestive of EP were actually positive by PCR, suggesting the need of a confirmatory diagnosis in these horses before EP treatment, since these clinical signs are not pathognomonic of the disease (Rothschild, 2013).

Blood smears examination revealed the presence of intraerythrocyte parasites compatible with *T. equi* and/or *B. caballi* in only 13 of the 140 horses, even when 60 horses tested positive for *T. equi*, *B. caballi* or both; showing that even though diagnosis by microscopic examination is easy to perform and most useful during the acute phase of infection, false-negative results are common since the number of parasites in blood may be low (mainly in *B. caballi* parasitemia) even during severe

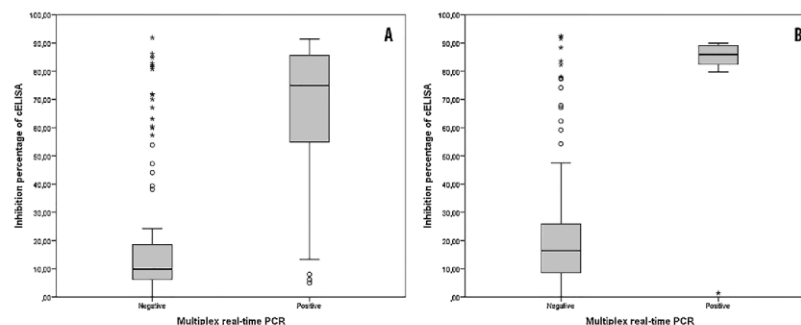


Fig. 1. The graphs describe the relationship between positive/negative PCR results and cELISA IP values for *T. equi* (Graph A) and for *B. caballi* (Graph B). Outliers represent either PCR negative horses with close (○)/distant (*) IP values from 40%, or PCR positive horses with a very low cELISA IP.

Table 1

Hematological and biochemical values from 140 horses with clinical signs suggestive of EP. Horses have been divided by their EP result (positive or negative) by PCR and cELISA. Values are shown as means ($\pm$ standard deviation) for each parameter.

Parameter (unit)	PCR			cELISA			Reference interval ^a
	Positive (n = 60)	Negative (n = 80)	p-value	Positive (n = 71)	Negative (n = 69)	p-value	
Red blood cell ($/10^6/\mu\text{l}$)	6.4 ($\pm$ 1.7)	7.0 ($\pm$ 1.1)	0.020 ^{b,c}	6.6 ($\pm$ 1.4)	6.9 ($\pm$ 1.4)	0.206 ^b	5.3 – 13.0
Hemoglobin (g/dl)	10.3 ($\pm$ 2.5)	11.3 ($\pm$ 1.8)	0.042 ^{b,c}	10.7 ($\pm$ 2.1)	11.1 ($\pm$ 2.2)	0.422 ^c	10.8 – 18.8
Packed cell volumen (%)	29.4 ($\pm$ 7.3)	32.2 ($\pm$ 5.3)	0.060 ^c	30.6 ($\pm$ 6.1)	31.4 ($\pm$ 6.6)	0.654 ^c	30.0 – 53.0
White blood cell ($/10^3/\text{mm}^3$)	9.3 ($\pm$ 2.7)	8.0 ($\pm$ 2.9)	0.002 ^{b,c}	9.4 ($\pm$ 3.0)	7.7 ($\pm$ 2.5)	0.001 ^{b,c}	5.0 – 11.0
Platelet count ($/10^3/\text{mm}^3$)	120 ($\pm$ 61)	135 ($\pm$ 59)	0.142 ^c	125 ($\pm$ 53)	132 ($\pm$ 66)	0.623 ^c	96 – 360
Total bilirubin (mg/dl)	2.9 ($\pm$ 2.6)	2.5 ($\pm$ 1.8)	0.616 ^c	2.4 ($\pm$ 1.4)	3.0 ($\pm$ 2.8)	0.209 ^c	0.1 – 2.5
Direct bilirubin (mg/dl)	0.40 ($\pm$ 0.65)	0.29 ($\pm$ 0.15)	0.159 ^c	0.29 ($\pm$ 0.14)	0.38 ($\pm$ 0.61)	0.415 ^c	0.01 – 0.67

^a Reference intervals for haematology were determined from a Urit 2900 Vet Plus TS (URIT Medical Electronic Group Co, LTD, Guilin, China), and from a reference population of 120 healthy horses residing in Spain using the same reagents (DILABO, Ciudad Real, Spain) and photometer (TECOM TC220, TECOM, Jiangxi, China) for biochemistry (data not published from the Equine Health Surveillance Unit, VISAVET Centre, Madrid, Spain).

^b By t-Student test.

^c By Mann-Whitney U test.

* Represents statistical significance for $p < 0.05$.

Table 2

Comparison of hematological and biochemical parameters between *T. equi*-positive and *T. equi*-negative horses found by real-time PCR or by cELISA. Values are shown as means ($\pm$ standard deviation) for each parameter.

Parameter (unit)	PCR			cELISA			Reference interval ^a
	Positive (n = 55)	Negative (n = 85)	p-value	Positive (n = 62)	Negative (n = 78)	p-value	
Red blood cell ($/10^6/\mu\text{l}$)	6.6 ($\pm$ 1.5)	6.8 ($\pm$ 1.3)	0.494 ^b	6.8 ($\pm$ 1.3)	6.7 ($\pm$ 1.5)	0.510 ^b	5.3 – 13.0
Hemoglobin (g/dl)	10.6 ($\pm$ 2.2)	11.0 ($\pm$ 2.1)	0.508 ^b	11.0 ($\pm$ 1.7)	10.7 ($\pm$ 2.4)	0.425 ^c	10.8 – 18.8
Packed cell volumen (%)	30.4 ($\pm$ 6.6)	31.4 ($\pm$ 6.2)	0.594 ^b	31.7 ($\pm$ 5.0)	30.5 ($\pm$ 7.3)	0.268 ^c	30.0 – 53.0
White blood cell ($/10^3/\text{mm}^3$)	9.5 ($\pm$ 2.7)	7.9 ($\pm$ 2.9)	0.001 ^{b,c}	9.5 ($\pm$ 3.1)	7.7 ($\pm$ 2.5)	0.001 ^{b,c}	5.0 – 11.0
Platelet count ($/10^3/\text{mm}^3$)	126 ($\pm$ 59)	130 ($\pm$ 61)	0.821 ^c	132 ($\pm$ 52)	126 ($\pm$ 66)	0.264 ^c	96 – 360
Total bilirubin (mg/dl)	2.9 ($\pm$ 2.7)	2.5 ($\pm$ 1.8)	0.968 ^c	2.4 ($\pm$ 1.4)	2.9 ($\pm$ 2.7)	0.185 ^c	0.1 – 2.5
Direct bilirubin (mg/dl)	0.42 ($\pm$ 0.68)	0.28 ($\pm$ 0.15)	0.070 ^c	0.29 ($\pm$ 0.15)	0.37 ($\pm$ 0.58)	0.347 ^c	0.01 – 0.67

^a Reference intervals for haematology were determined from a Urit 2900 Vet Plus TS (URIT Medical Electronic Group Co, LTD, Guilin, China), and from a reference population of 120 healthy horses residing in Spain using the same reagents (DILABO, Ciudad Real, Spain) and photometer (TECOM TC220, TECOM, Jiangxi, China) for biochemistry (data not published from the Equine Health Surveillance Unit, VISAVET Centre, Madrid, Spain).

^b By t-Student test.

^c By Mann-Whitney U test.

* Represents statistical significance for $p < 0.05$.

Table 3

Comparison of hematological and biochemical parameters between *B. caballi*-positive and *B. caballi*-negative horses found by real-time PCR or by cELISA. Values are shown as means ($\pm$ standard deviation) for each parameter.

Parameter (unit)	PCR			cELISA			Reference interval ^a
	Positive (n = 8)	Negative (n = 132)	p-value	Positive (n = 23)	Negative (n = 117)	p-value	
Red blood cell ($/10^6/\mu\text{l}$)	4.7 ($\pm$ 1.5)	6.8 ($\pm$ 1.3)	0.004 ^{b,c}	5.6 ($\pm$ 1.4)	6.9 ($\pm$ 1.3)	< 0.001 ^{b,c}	5.3 – 13.0
Hemoglobin (g/dl)	7.6 ($\pm$ 2.4)	11.1 ($\pm$ 2.0)	< 0.001 ^{b,c}	9.3 ($\pm$ 2.3)	11.2 ($\pm$ 2.0)	0.001 ^c	10.8 – 18.8
Packed cell volumen (%)	22.3 ($\pm$ 7.2)	31.5 ($\pm$ 6.0)	0.001 ^{b,c}	27.4 ($\pm$ 7.2)	31.7 ($\pm$ 6.0)	0.007 ^{b,c}	30.0 – 53.0
White blood cell ($/10^3/\text{mm}^3$)	8.7 ($\pm$ 2.5)	8.5 ($\pm$ 2.9)	0.723 ^c	8.5 ($\pm$ 2.2)	8.5 ($\pm$ 3.0)	0.710 ^c	5.0 – 11.0
Platelet count ($/10^3/\text{mm}^3$)	64 ($\pm$ 32)	132 ($\pm$ 59)	< 0.001 ^{b,c}	85 ($\pm$ 30)	137 ($\pm$ 61)	< 0.001 ^{b,c}	96 – 360
Total bilirubin (mg/dl)	2.6 ($\pm$ 1.6)	2.7 ($\pm$ 2.2)	0.950 ^c	2.3 ($\pm$ 1.2)	2.7 ($\pm$ 2.4)	0.679 ^c	0.1 – 2.5
Direct bilirubin (mg/dl)	0.23 ($\pm$ 0.06)	0.34 ($\pm$ 0.46)	0.091 ^c	0.27 ($\pm$ 0.06)	0.35 ($\pm$ 0.48)	0.783 ^c	0.01 – 0.67

^a Reference intervals for haematology were determined from a Urit 2900 Vet Plus TS (URIT Medical Electronic Group Co, LTD, Guilin, China), and from a reference population of 120 healthy horses residing in Spain using the same reagents (DILABO, Ciudad Real, Spain) and photometer (TECOM TC220, TECOM, Jiangxi, China) for biochemistry (data not published from the Equine Health Surveillance Unit, VISAVET Centre, Madrid, Spain).

^b By t-Student test.

^c By Mann-Whitney U test.

* Represents statistical significance for $p < 0.05$.

infection (Wise et al., 2014).

The percentage of seropositivity for *T. equi* (44.3%) and *B. caballi* (16.4%) found in horses presenting clinical signs of EP of this study was obviously higher than that reported for a general population of healthy

horses in central Spain (Camino et al., 2018). Our findings regarding the percentage of *T. equi* and *B. caballi* positives by PCR in the horses with clinical suspicion were in agreement with the studies carried out in most endemic regions where, in general, *T. equi* infected horses are

more common than those infected by *B. caballi* (Bartolome Del Pino et al., 2016; Posada-Guzman et al., 2015); however this is not the case in other regions such as Mongolia (Munkhjargal et al., 2013).

Compared to the results for *T. equi*, where the number of positive horses detected by cELISA and real-time PCR was very similar, a slightly lower agreement was seen between both tests for *B. caballi*, since a significantly higher number of horses tested positive by cELISA than by real-time PCR. While positive results by PCR indicate current active parasite infestation, cELISA positive results show past or chronic infections (Butler et al., 2012). According to this, our results could involve a lower presence of *B. caballi* carrier horses than *T. equi* in our study. This would be in agreement with the fact that the carrier state in horses infected with *B. caballi* is short and the parasite usually disappears from the bloodstream after treatment or 1–4 years post-infection in natural recovery, while *T. equi* is more difficult to eliminate due to the parasitemia being typically higher, so the horses can remain as life-long carriers (Bruning, 1996). Nevertheless, the differences in the agreement for both parasites could also be due to the fact that these two techniques have different targets [PCR targets the 18S gene while *T. equi* cELISA targets EMA-1 (equi merozoite antigen 1) and *B. caballi* cELISA targets RAP-1 (rhoptry-associated protein 1)] (Bhoora et al., 2010; Kappmeyer et al., 1999; Katz et al., 2000; Kim et al., 2008; Knowles et al., 1992).

This is the first study to evaluate the association between PCR results and cELISA IP values. In the horses with clinical signs suggestive of EP included in our study, a high IP in the *B. caballi* cELISA was associated with positive PCR results, whereas for *T. equi*, a low IP was also associated with positive PCR results. This fact could be related to the kinetics of antibody responses; studies in experimentally infected horses have demonstrated the presence of *T. equi* in bloodstream by PCR from the first week post-inoculation, whereas initial detection of infection by cELISA was possible between 5 and 12 weeks (Grause et al., 2013). Regarding *B. caballi*, Schwint et al. (2009) were able to demonstrate the presence of the parasite and the antibodies by means of both PCR and cELISA at the same time [within 8 (inoculation) or 12 (tick borne) days post-transmission].

According to our results, hematological alterations caused by EP included a decrease in the RBC count and Hb concentration, with increased values of WBC. Similar findings were reported in EP positive equids in Egypt, although no significant differences were found regarding WBC (Mahmoud et al., 2016). There were differences in the blood count between *T. equi*/*B. caballi*-parasitized horses. Horses positive for *T. equi* (by PCR and/or cELISA) showed a significant rise in WBC, whereas horses positive for *B. caballi* presented a significant decrease of RBC, PCV, Hb and platelet counts. Even though leukopenia is more frequent in acute forms of EP (Dewaai, 1992), leukocytosis in *T. equi* infections was also seen in a study carried out in racehorses in Jordan (Hailat et al., 1997) and it may be related with its ability to invade the peripheral blood mononuclear cells at the initial stage (Mehlhorn and Schein, 1998). In general, *T. equi* presence has been associated with a more severe disease (Camacho et al., 2005; Zobba et al., 2008) but, unexpectedly, in this study a significantly more severe anemia was observed in *B. caballi* infected horses by using both cELISA (RBC p value < 0.001; Hb p value = 0.002; PCV p value = 0.002) and PCR (RBC p value = 0.001; Hb p value = 0.002; PCV p value = 0.003), and thrombocytopenia was also observed in these horses (p value < 0.001). Thrombocytopenia is a very characteristic feature of canine babesiosis (Mierzejewska et al., 2014), and it has also been reported in studies in equine (Camacho et al., 2005; Zobba et al., 2008), although normal levels have been found elsewhere (Ionita et al., 2018).

Finally, a positive correlation was found which suggests that, as the cELISA IP increases, the levels of total bilirubin and number of WBC also raise, for *B. caballi* and *T. equi*, respectively. The increase in the IP was also associated with a significant decrease of RBC, PCV, Hb and platelet count in *B. caballi* infections. We did not observe a significant difference with the direct bilirubin values; which may be explained by

the fact that hyperbilirubinemia, a consequence of hemolytic anemia, is the most frequent biochemical alteration in EP and it is produced by an increase in the indirect (unconjugated) bilirubin (Rothschild, 2013).

5. Conclusions

Data presented here confirmed that *T. equi* infections are more prevalent than *B. caballi* infections in horses with clinical signs suggesting EP in Spain; however, only 80 (57%) out of 140 horses with clinical signs compatible with EP were actually cELISA and/or PCR positive. We believe that most positive horses in our study could be *T. equi*-carriers suffering a relapse (acute or sub-acute disease), while *B. caballi* would be mainly responsible for primary infections (acute or sub-acute disease). When using cELISA in horses with clinical signs of EP, a high IP (> 78%) for *B. caballi* would be suggestive of an active infection, although PCR would be recommended for confirmation. The haemogram could guide the veterinary surgeon towards the diagnosis of *T. equi* or *B. caballi*; however PCR would be the test of choice in order to confirm the diagnosis. Information about the importance of correct diagnosis, treatment and control measures of EP should be given to the veterinarians in order to allow the early detection of cases and prevent the spread of the disease, as well as to avoid the common practice of treating horses without a laboratory diagnosis of EP.

Animal welfare

The whole sampling related to this study underwent the Ethical Committee of the Universidad Complutense de Madrid. The owners of the horses included in the study received an information sheet with all the information regarding the study and they signed an informed consent that would allow the samples to be used in further studies.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest in the subject, matter or materials discussed in this manuscript.

Acknowledgments

Camino, E. was supported by the Grants for Predoctoral Researchers of the Complutense University of Madrid (CT27/16). We are grateful to the technicians and the IT department at the VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense, Madrid, Spain, for their help in the processing of the samples and the editing of the figure included in the manuscript, respectively. We are also grateful to all the veterinary surgeons and stud farm owners that participated in this study.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108928>.

References

- Bartolome Del Pino, L.E., Nardini, R., Veneziano, V., Iacoponi, F., Cersini, A., Autorino, G.L., Buono, F., Scicluna, M., 2016. Babesia caballi and Theileria equi infections in horses in Central-Southern Italy: sero-molecular survey and associated risk factors. *Ticks Tick. Dis.* 7, 462–469.
- Bhoora, R., Quan, M., Franssen, L., Butler, C.M., Van der Kolk, J.H., Guthrie, A.J., Zweygarth, E., Jongejans, F., Collins, N.E., 2010. Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of Babesia caballi and Theileria equi infections in horses from South Africa. *Vet. Parasitol.* 168, 201–211.
- Bruning, A., 1996. Equine piroplasmosis: an update on diagnosis, treatment and prevention. *Br. Vet. J.* 152, 139–151.
- Butler, C.M., Sioet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M., Stout, T.A., van der Kolk, J.H., Wollenberg, L., Nielsen, M., Jongejans, F., Werners, A.H., 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. *Vet. J.* 193, 381–385.
- Camacho, A.T., Guitián, F.J., Pallas, E., Gestal, J.J., Olmeda, A.S., Habela, M.A., Telford III, S.R., Spielman, A., 2005. Theileria (Babesia) equi and Babesia caballi infections in horses in Galicia, Spain. *Trop. Anim. Health Prod.* 37, 293–302.
- Camino, E., de la Cruz, M.L., Domínguez, L., Carvajal, K.A., Fores, P., de Juan, L., 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. *J. Equine Vet. Sci.* 67, 81–86.
- Coutinho, R.M., Phipps, P., Dalley, C., Lewis, J., Hammond, T.A., Shiels, B.R., Weir, W., Sutton, D.G.M., 2019. Equine piroplasmosis status in the UK: an assessment of laboratory diagnostic submissions and techniques. *Vet. Rec.* 184, 95.
- Dewaai, D.T., 1992. Equine piroplasmosis - a review. *Br. Vet. J.* 148, 6–14.
- Friedhoff, K.T., Tenter, A.M., Muller, I., 1990. Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. *Rev. Sci. Technol.* 9, 1187–1194.
- García-Bocanegra, I., Arenas-Montes, A., Hernández, E., Adaszek, L., Carbonero, A., Almería, S., Jaen-Tellez, J.A., Gutiérrez-Palomino, P., Arenas, A., 2013. Seroprevalence and risk factors associated with Babesia caballi and Theileria equi infection in equids. *Vet. J.* 195, 172–178.
- Graue, J.F., Ueti, M.W., Nelson, J.T., Knowles, D.P., Kappmeyer, L.S., Bunn, T.O., 2013. Efficacy of imidocarb dipropionate in eliminating Theileria equi from experimentally infected horses. *Vet. J.* 196, 541–546.
- Hallat, N.Q., Lafi, S.Q., al-Darraj, A.M., al-Ani, F.K., 1997. Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. *Vet. Parasitol.* 69, 1–8.
- Holman, P.J., Frerichs, W.M., Chaves, L., Wagner, G.G., 1993. Culture confirmation of the carrier status of Babesia caballi-infected horses. *J. Clin. Microbiol.* 31, 698–701.
- Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford 3rd, S.R., Krause, P.J., Persing, D.H., 2000. Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 451–469.
- Ionita, M., Nicorescu, L.M., Pfister, K., Mitrea, I.L., 2018. Parasitological and molecular diagnostic of a clinical Babesia caballi outbreak in Southern Romania. *Parasitol. Res.* 117, 2333–2339.
- Kappmeyer, L.S., Perryman, L.E., Hines, S.A., Baszler, T.V., Katz, J.B., Hennager, S.G., Knowles, D.P., 1999. Detection of equine antibodies to Babesia caballi by recombinant B. caballi rhoptry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2285–2290.
- Katz, J., Dewald, R., Nicholson, J., 2000. Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of Babesia equi, Babesia caballi, Trypanosoma equiperdum, and Burkholderia mallei infection in horses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 46–50.
- Kim, C.M., Blanco, L.B., Alhassan, A., Iseki, H., Yokoyama, N., Xuan, X., Igarashi, I., 2008. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of Theileria equi from equine blood samples. *Vet. Parasitol.* 151, 158–163.
- Knowles Jr., D., 1996. Equine babesiosis (piroplasmosis): a problem in the international movement of horses. *Br. Vet. J.* 152, 123–126.
- Knowles Jr., D.P., Kappmeyer, L.S., Stiller, D., Hennager, S.G., Perryman, L.E., 1992. Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with Babesia equi. *J. Clin. Microbiol.* 30, 3122–3126.
- Kumar, S., Malhotra, D.V., Nichani, A.K., 2002. Identification of immunoreactive polypeptides of Babesia equi parasite during immunization. *Vet. Parasitol.* 107, 295–301.
- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159–174.
- Leblond, A., 2019. Equine piroplasmosis - the view of a practitioner from an endemic region. *Vet. Rec.* 184, 92–94.
- Mahmoud, M.S., El-Ezz, N.T., Abdel-Shafy, S., Nassar, S.A., El Namaky, A.H., Khalil, W.K., Knowles, D., Kappmeyer, L., Silva, M.G., Suarez, C.E., 2016. Assessment of Theileria equi and Babesia caballi infections in equine populations in Egypt by molecular, serological and hematological approaches. *Parasit. Vectors* 9, 260.
- Malekifard, F., Tavassoli, M., Yakhchali, M., Darvishzadeh, R., 2014. Detection of Theileria equi and Babesia caballi using microscopic and molecular methods in horses in suburb of Urmia, Iran. *Vet. Res. Forum* 5, 129–133.
- Maurer, F.D., 1962. Equine piroplasmosis-another emerging disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 141, 699–8.
- Mehlhorn, H., Schein, E., 1998. Redescription of Babesia equi Laveran, 1901 as Theileria equi Mehlhorn, Schein 1998. *Parasitol. Res.* 84, 467–475.
- Mierzejewska, E.J., Welc-Faleciak, R., Bednarska, M., Rodo, A., Bajer, A., 2014. The first evidence for vertical transmission of Babesia canis in a litter of Central Asian Shepherd dogs. *Ann. Agric. Environ. Med.* 21, 500–503.
- Moretti, A., Mangili, V., Salvatori, R., Maresca, C., Scoccia, E., Torina, A., Moretta, I., Gabrielli, S., Tampieri, M.P., Pietrobelli, M., 2010. Prevalence and diagnosis of Babesia and Theileria infections in horses in Italy: a preliminary study. *Vet. J.* 184, 346–350.
- Munkhjargal, T., Sivakumar, T., Battsetseg, B., Nyamjargal, T., Aboulalia, M., Purevtseren, B., Bayarsaikhan, D., Byambaa, B., Terkawi, M.A., Yokoyama, N., Igarashi, I., 2013. Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province, Mongolia. *Infect. Genet. Evol.* 16, 178–185.
- Posada-Guzman, M.F., Dolz, G., Romero-Zuniga, J.J., Jimenez-Rocha, A.E., 2015. Detection of Babesia caballi and Theileria equi in blood from equines from four indigenous communities in Costa Rica. *Vet. Med. Int.* 236278 2015.
- Rothschild, C.M., 2013. Equine piroplasmosis. *J. Equine Vet. Sci.* 33, 497–508.
- Schwint, O.N., Ueti, M.W., Palmer, G.H., Kappmeyer, L.S., Hines, M.T., Cordes, R.T., Knowles, D.P., Scoles, G.A., 2009. Imidocarb Dipropionate Clears Persistent Babesia caballi infection with elimination of transmission potential. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4327–4332.
- Scoles, G.A., Ueti, M.W., 2015. Vector ecology of equine piroplasmosis. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 561–580.
- Short, M.A., Clark, C.K., Harvey, J.W., Wenzlow, N., Hawkins, I.K., Allred, D.R., Knowles, D.P., Corn, J.L., Graue, J.F., Hennager, S.G., Kitchen, D.L., Traub-Dargatz, J.L., 2012. Outbreak of equine piroplasmosis in Florida. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 240, 588–595.
- Taylor, W.M., Bryant, J.E., Anderson, J.B., Willers, K.H., 1969. Equine piroplasmosis in the United States-a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 155, 915–919.
- VMRD, 2017. Equine piroplasmosis. Veterinary Diagnostic Test Kits and Reagents. pp. 3–4.
- Wise, L.N., Kappmeyer, L.S., Mealey, R.H., Knowles, D.P., 2013. Review of equine piroplasmosis. *J. Vet. Intern. Med.* 27, 1334–1346.
- Wise, L.N., Peitzel-McClenney, A.M., Mealey, R.H., Knowles, D.P., 2014. Equine piroplasmosis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 30, 677–693.
- Ybanez, A.P., Ybanez, R.H.D., Talle, M.G., Arregio, R.M.T., Geens, M.J.C., Villas 3rd, J.G.I., Villar, S.R., Laruga, C.L., Cao, S., Moumouni, F.P.A., Liu, M., Igarashi, I., Xuan, X., 2018. Serological and molecular detection of Theileria equi and Babesia caballi in Philippine horses. *Ticks Tick. Dis.* 9, 1125–1128.
- Zobba, R., Ardu, M., Niccolini, S., Chessa, B., Manna, L., Cocco, R., Parpaglia, M.L.P., 2008. Clinical and laboratory findings in equine piroplasmosis. *J. Equine Vet. Sci.* 28, 301–308.

4.3.2 Artículo 4: Importancia de la presencia de anticuerpos frente a la piroplasmosis equina en caballos con destino exportación residentes en España

Referencia publicación: Camino, E., Pozo, P., Dorrego, A., Carvajal, K.A., Buendia, A., Gonzalez, S., de Juan, L., Dominguez, L., Cruz-Lopez, F., 2020. *Importance of equine piroplasmosis antibody presence in Spanish horses prior to export. Ticks Tick Borne Dis* 11, 101329.

Este artículo fue publicado en el año 2020 en la revista "Ticks and Tick-borne Diseases" [factor de impacto 2019: 2.749, cuartil 2019: Q2, ranking 2019: 11/39 (*Parasitology*)].

Resumen:

El análisis serológico de la piroplasmosis equina, enfermedad parasitaria causada por *B. caballi* y/o *T. equi* y transmitida por garrapatas, es uno de los principales requisitos para la exportación de caballos impuesto por la mayoría de países del mundo. Un resultado positivo en dicho análisis impide la entrada del caballo al país de destino, hecho que implica un elevado impacto económico negativo para el sector equino de países con PE endémica, como es España. El principal problema de la PE es que la mayoría de los caballos que superan esta enfermedad quedan como portadores de estos parásitos hasta 4 años (*B. caballi*) o de por vida (*T. equi*). Desde el año 2005, el cELISA es la técnica serológica de elección para el diagnóstico de PE en caballos con destino exportación debido a su alta sensibilidad para la detección de infecciones crónicas o inaparentes.

El movimiento intra y extracomunitario de caballos es una actividad que ha ido creciendo con los años en nuestro país, suponiendo un impacto económico de 58 millones de euros para la industria equina española en el año 2012. Pese a esta importante estimación, poco se conoce acerca de las pérdidas económicas que la PE implica en relación con la exportación de caballos. El objetivo de este estudio fue conocer la seroprevalencia de PE en caballos sometidos a un análisis pre-exportación. Para ello, se analizaron 3.368 caballos de distintas razas y aptitudes utilizando la técnica

cELISA con el fin de detectar anticuerpos IgG frente a *T. equi* y *B. caballi*. Las muestras se recibieron durante un periodo 3 años (2015-2016, 2016-2017, 2017-2018) y se dividieron en base a la época del año en que fueron recogidas. La seroprevalencia nacional de PE y aquella existente en cada CCAA se determinó de acuerdo a la población de caballos registrada en España en el año 2013.

La prueba de cELISA reveló que el 21.0% (95% IC 19.6-22.4) de las muestras presentaban anticuerpos IgG frente a *T. equi*, mientras que el 5.6% (95% IC 4.9-6.4) eran positivas a *B. caballi*. Solo el 2.5% (95% IC 2.0-3.0) de las muestras fueron positivas para ambos parásitos. El análisis de posibles variaciones en la seroprevalencia de dichos parásitos durante los tres años de estudio mostró diferencias leves en el número de casos positivos a *T. equi*; sin embargo, se encontró un aumento significativo del 2.2% ($p = 0.031$) en la seroprevalencia de *B. caballi*. Dicho incremento significativo también fue detectado en las muestras recibidas en otoño e invierno ($p = 0.030$). Estos resultados podrían sugerir una propagación de *B. caballi* en toda España junto con un aumento del número de infecciones en primavera y verano (épocas de mayor actividad del vector), las cuales serían detectables serológicamente en otoño e invierno. Extremadura y Castilla y León fueron las CCAA con una mayor probabilidad de encontrar caballos seropositivos a PE; mientras que Cataluña y Andalucía mostraron los valores de seroprevalencia más bajos, lo que puede ser debido a una mayor concienciación en la implementación de medidas de control en estas regiones para evitar la exposición a las garrapatas.

En base a los resultados del cELISA, un 24.1% (95% IC 22.6-25.5) de los caballos con destino exportación no van a poder ser comercializados a países extranjeros, suponiendo así pérdidas anuales de 14.5 millones de euros, asociadas tanto a la imposibilidad de la exportación como a la inversión realizada en la cría y entrenamiento de estos caballos. El uso de acaricidas y la realización de chequeos serológicos anuales de PE podrían ayudar a aumentar el número de caballos exportados a otros países.



Contents lists available at ScienceDirect

Ticks and Tick-borne Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ttbdis

Short communication

Importance of equine piroplasmosis antibody presence in Spanish horses prior to export

Eliazar Camino^{a,b}, Pilar Pozo^c, Abel Dorrego^a, Kelly Alejandra Carvajal^a, Aranzazu Buendia^a, Sergio Gonzalez^a, Lucía de Juan^{a,b}, Lucas Dominguez^{a,b}, Fatima Cruz-Lopez^{a,*}^a VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense, Madrid, Spain^b Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain^c MAEVA SERVET, S.L., Alameda del Valle, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

*Theileria equi**Babesia caballi*

Spain

Exportation

Seroprevalence

ABSTRACT

Serological analysis of equine piroplasmosis (EP), caused by *Theileria equi* and *Babesia caballi*, is included in the export testing requirements for most of the countries worldwide, thus involving a high economic impact on equine industry of EP-endemic countries, such as Spain. A total of 3368 serum samples from healthy horses collected prior to export between 2015 and 2018 in Spain were tested for antibodies against *T. equi* and *B. caballi* by using a competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA). The overall seroprevalence results in Spain revealed that almost a quarter of the horses analysed (24.1 %; 95% CI 22.6–25.5) could not be exported to countries free from EP. The implementation of prevention measures such as the use of acaricides and daily checks for ticks in horses, as well as regular serological screening of horses in Spain would aid to increase the number of horses exported to other countries.

1. Introduction

Exportation of horses has a great economic impact for the Spanish equestrian sector, with an estimated value of 58 million euros in 2012 (Deloitte, 2013). These exports are restricted by the mandatory analysis of antibodies against equine piroplasmosis (EP) imposed by the majorities of countries of destination.

EP is caused by two intraerythrocytic protozoan parasites transmitted mainly by ixodid ticks: *Theileria equi* (*T. equi*) and *Babesia caballi* (*B. caballi*) (Rothschild, 2013). After the infection, horses can remain carriers from 1 to 4 years (*B. caballi*) or life-long (*T. equi*) (Onyiche et al., 2019).

The diagnosis for EP in horses prior to exportation is usually carried out by using serological tests (García-Bocanegra et al., 2013). The cELISA is the test of choice for many countries due to its high sensitivity in case of inapparent and chronic infections (Knowles et al., 1992; Anon, 2014), although some recent studies are advocating a combination of techniques (cELISA, complement fixation test (CFT), immunofluorescence antibody test (IFAT) and polymerase chain reaction (PCR)) in order to complement the diagnosis (Bhoora et al., 2010; Wise et al., 2019).

To date, several studies have evaluated the epidemiological

situation of EP in different areas of Spain (Camacho et al., 2005; Camino et al., 2018; García-Bocanegra et al., 2013; Montes Cortes et al., 2017); but there are no published data regarding the importance of EP in the exportation of horses from Spain. This study aimed at determining the seroprevalence of EP in samples from horses prior to exportation in Spain, and may help to have a greater knowledge of the economic losses that EP involves for the equine Spanish sector.

2. Material and methods

2.1. Sample collection

This cross-sectional study was carried out with serum samples from 3368 healthy horses of different breeds and aptitudes (breeding, sport and leisure) without a history of travelling abroad Spain and residing in 15 of the 17 autonomous communities in Spain, which were sent to the Equine Health Surveillance Unit (VISAVET Centre) between September 2015 and August 2018 for their pre-exportation analysis (Fig. 1). Sampled horses included 1778 males, 1029 females and 561 samples with no information about sex. Samples were divided by seasonal (winter: 691; summer: 851; autumn: 777 and spring: 1049) and year data (September 2015–August 2016: 1065; September 2016–August

* Corresponding author at: VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

E-mail address: fatimacr@ucm.es (F. Cruz-Lopez).

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101329>

Received 20 March 2019; Received in revised form 25 October 2019; Accepted 7 November 2019

Available online 08 November 2019

1877-959X/ © 2019 Published by Elsevier GmbH.

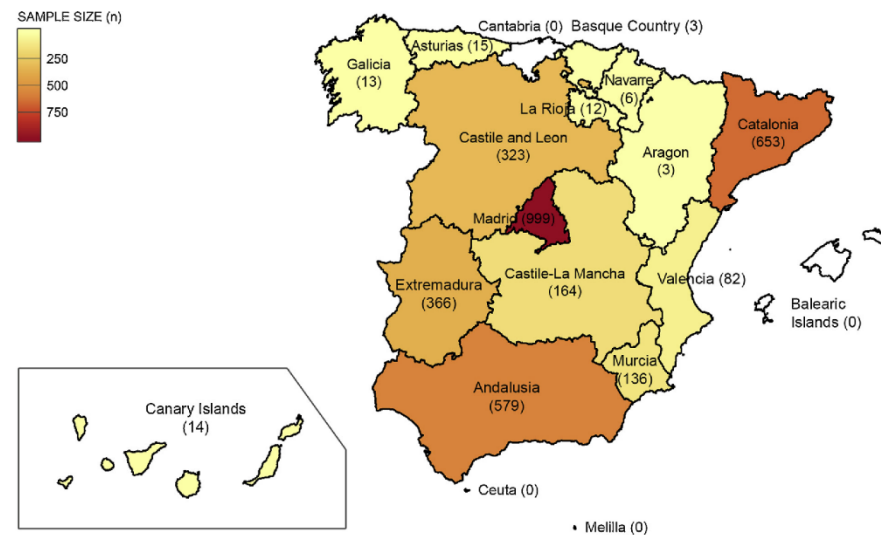


Fig. 1. Spanish autonomous communities participating in the study and number of samples received from each of them.

2017: 1146 and September 2017–August 2018: 1157).

2.2. Antibody-detection competitive ELISA

From each horse 10 ml of whole blood without anticoagulant were received. Blood samples were centrifuged at 2500 rpm for 5 min at 4 °C and serum from each horse was tested according to manufacturer's instructions by two commercial cELISA kits (VMRD® Inc., Pullman, WA, USA) for the determination of IgG-specific antibodies against *T. equi* and *B. caballi*.

2.3. Statistical analysis

The overall true seroprevalence in Spain and the true seroprevalences by autonomous community were calculated by using software WinEpi, based on the population of equids registered in Spain in 2013 ($n = 723,496$) and according to the number of equids residing in each autonomous community (Deloitte, 2013). These data were developed in accordance with the sensitivity and specificity of the two cELISA kits provided by the manufacturer in its catalog of diagnostic kits 2017 (VMRD, 2017).

All statistical analysis were conducted using Chi square test (X^2) by the software Small STATA version 12.0.

3. Results and discussion

The cELISA tests revealed that 686 samples of the 3368 analyzed (21.0 %; 95% IC 19.6–22.4) presented IgG antibodies against *T. equi*, whereas 193 (5.6 %; 95% IC 4.9–6.4) were positive for *B. caballi* and 96 (2.5 %; 95% IC 2.0–3.0) were positive for both *T. equi* and *B. caballi*. Overall, the true seroprevalence of *T. equi* was significantly higher ($p < 0.001$) than that for *B. caballi*, similarly to previous studies developed in Spain (Camino et al., 2018).

Within the samples whose sex information was known, there was no statistically significant association between sex and seropositivity to *T. equi* ($p = 0.664$) or *B. caballi* ($p = 0.919$).

Regarding the EP seroprevalence in the three years of the study (September 2015–August 2016, September 2016–August 2017 and September 2017–August 2018), the seroprevalence of *T. equi* showed slight, non-significant differences (from 21.9%–18.7% and back to 20.7 %, $p = 0.166$) whereas for *B. caballi* there was an overall, significant increase of 2.2 % ($p = 0.031$) (from 4.8 % to 5.3 % and a further increase to 7.0 %, $p = 0.062$), showing that *T. equi* would be stabilized, whereas *B. caballi* could be spreading in the horse population in Spain. Regarding the influence of the season when the samples were collected, our study demonstrated that samples collected in autumn and winter showed a statistically significant increase in *B. caballi* seroprevalence ($p = 0.030$), which was not seen for *T. equi* ($p = 0.240$). The spread of *B. caballi* in the horse population in Spain could be causing infections during the summer (due to a higher presence of the vector) which would be serologically detected in autumn and winter (Khajuria et al., 2015).

Previous studies in Spain have shown EP seroprevalences ranging from 38.1–67.5% in Madrid and Castile-La Mancha, respectively (Camacho et al., 2005; Garcia-Bocanegra et al., 2013; Montes Cortes et al., 2017). In this study, lower seroprevalence values were obtained in these regions (Fig. 2). This differences may be due to the number of samples tested and the acaricidal measures applied to horses and stables in those areas (presumably, horses to be exported will have better management and cares).

Our results would suggest that Castile and Leon and Extremadura would be the autonomous communities most likely to find seropositive horses (42.7 %; 95% CI 37.3–48.1 and 38.8 %; 95%CI 33.8–43.8 respectively). On the other hand, equines resident in certain autonomous communities, such as Andalusia and Catalonia, would have lower chances to pose problems for their exportation due to the lower EP seroprevalence in these regions (15.9 %; 95%CI 12.9–18.9 and 17.1 %; 95%CI 14.3–20.0 respectively), possibly due to a higher awareness in the implementation of control measures in order to avoid the exposure to ticks in these areas, which historically have been areas of high prevalence of EP (Garcia-Bocanegra et al., 2013).

Based on this research, a total of 783 horses (24.1 %; 95% CI

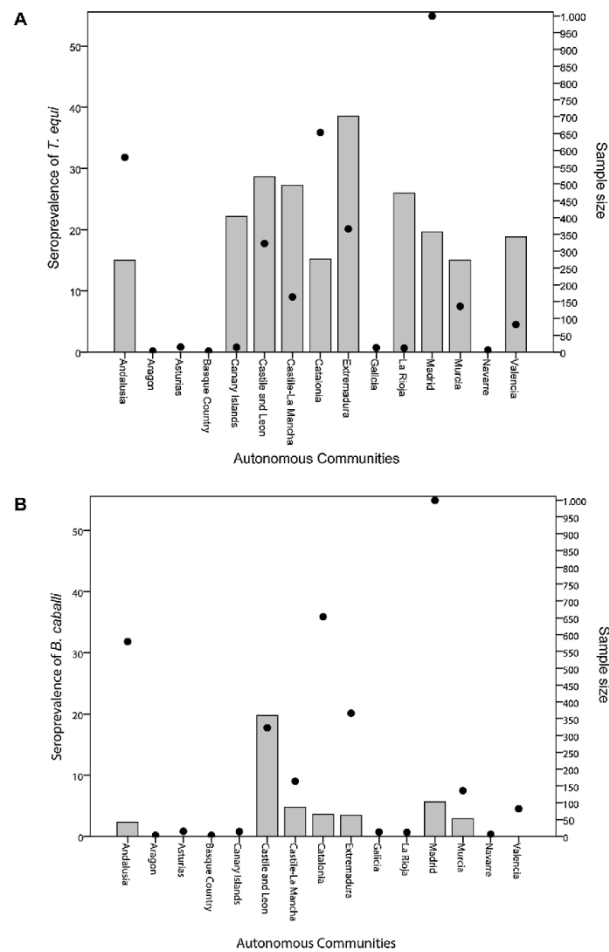


Fig. 2. The graphs represent the number of horses sampled prior to exportation in each autonomous community (black dots) and the true seroprevalence results obtained (grey bars) for *T. equi* (Graph A) and for *B. caballi* (Graph B). Autonomous communities where the sampling rate was < 0.1 % are not represented.

22.6–25.5) tested prior to exportation presented antibodies against EP. This would entail that almost a quarter of the horses tested could not be exported. Considering the economic impact of the export of horses in 2012 (Deloitte, 2013), at least 14.5 million euro would be lost each year in Spain due to these horses not being exported, along with the indirect expenses of raising and training these horses, the value of which is drastically decreased after a positive EP serological result. This is the first survey to show the consequences of EP in the exportation of horses from different regions of Spain. Further studies must be conducted to investigate the management practices of horses with respect to the prevention of exposure to tick vectors involved in transmission in order to reduce the economic losses that EP involves for the Spanish equine industry. The implementation of prevention measures such as the use of acaricides and daily checks for ticks in the horses should be encouraged in the stud farms or livery yards. Furthermore, a regular (at least once a

year) mandatory serological screening of horses in Spain (up to date a clinical suspicion of EP must be notified to the authorities but no official serological screenings are carried out) would aid to increase the number of horses exported to other countries.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest in the subject, matter or materials discussed in this manuscript.

Acknowledgments

Camino, E. was supported by the Grants for Predoctoral Researchers of the Complutense University of Madrid (CT27/16).

References

- Anon, 2014. Equine piroplasmosis. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.5.8.
- Bhoola, R., Quan, M., Franssen, L., Butler, C.M., Van der Kolk, J.H., Guthrie, A.J., Zweygardt, E., Jongejan, F., Collins, N.E., 2010. Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses from South Africa. *Vet. Parasitol.* 168 (3–4), 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.11.011>.
- Camacho, A.T., Guitián, F.J., Pallas, E., Gestal, J.J., Olmeda, A.S., Habela, M.A., Telford III, S.R., Spielman, A., 2005. *Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain. *Trop. Anim. Health Prod.* 37 (4), 293–302. <https://doi.org/10.1007/s11250-005-5691-z>.
- Camino, E., de la Cruz, M.L., Domínguez, L., Carvajal, K.A., Fores, P., de Juan, L., 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. *J. Equine Vet. Sci.* 67, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.03.012>.
- Deloitte, 2013. Estudio del Impacto del Sector Ecuéstre en España. Real Federación Hípica Española.
- García-Bocanegra, I., Arenas-Montes, A., Hernández, E., Adaszek, L., Carbonero, A., Almería, S., Jaen-Tellez, J.A., Gutiérrez-Palomino, P., Arenas, A., 2013. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. *Vet. J.* 195 (2), 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.06.012>.
- Khajuria, V., Godam, R., Yadav, A., Katoch, R., 2015. Prevalence of ixodid ticks in dairy animals of Jammu region. *J. Parasit. Dis.* 39 (3), 418–421. <https://doi.org/10.1007/s12639-013-0354-4>.
- Knowles Jr, D.P., Kappmeyer, L.S., Stiller, D., Hennager, S.G., Perryman, L.E., 1992. Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi*. *J. Clin. Microbiol.* 30 (12), 3122–3126.
- Montes Cortes, M.G., Fernandez-Garcia, J.L., Habela Martínez-Estélez, M.A., 2017. Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Spain. *Parasite* 24 (14). <https://doi.org/10.1051/parasite/2017015>.
- Onyiche, T.E., Suganuma, K., Igarashi, I., Yokoyama, N., Xuan, X., Thekisoe, O., 2019. A review on equine piroplasmosis: epidemiology, vector ecology, risk factors, host immunity, diagnosis and control. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16 (10), 1736. <https://doi.org/10.3390/ijerph16101736>.
- Rothschild, C.M., 2013. Equine piroplasmosis. *J. Equine Vet. Sci.* 33 (7), 497–508. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.03.189>.
- VMRD, 2017. Equine piroplasmosis. Veterinary Diagnostic Test Kits and Reagents. pp. 3–4.
- Wise, L.N., Kappmeyer, L.S., Knowles, D.P., White, S.N., 2019. Evolution and diversity of the EMA families of the divergent equid parasites, *Theileria equi* and *T. Haneyi*. *Infect. Genet. Evol.* 68, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.12.020>.

4.3.3 Artículo 5: Análisis filogenético y distribución geográfica de secuencias de *Theileria equi* y *Babesia caballi* procedentes de caballos residentes en España

Referencia publicación: Camino, E., Cruz-Lopez, F., de Juan, L., Dominguez, L., Shiels, B., Coultous, R.M., 2020. *Phylogenetic analysis and geographical distribution of Theileria equi and Babesia caballi sequences from horses residing in Spain. Ticks Tick-Borne Dis* 11, 101521.

Este artículo fue publicado en el año 2020 en la revista "Ticks and Tick-borne Diseases" [factor de impacto 2019: 2.749, cuartil 2019: Q2, ranking 2019: 11/39 (*Parasitology*)].

Resumen:

Los protozoos *T. equi* y *B. caballi* son los agentes causantes de la piroplasmosis equina, enfermedad transmitida por garrapatas ixódidas y extendida por todo el mundo. La PE tiene una gran importancia para el sector equino español debido a su significativo impacto en el comercio equino internacional. La diversidad genética de estos parásitos se ha estudiado principalmente mediante análisis filogenéticos basados en el gen 18S rRNA, los cuales han descrito la presencia de hasta 5 genotipos (A, B, C, D y E) para *T. equi* y 3 (A, B y C) para *B. caballi*.

Aunque España es un país endémico de PE, solo se conoce la filogénesis de estos parásitos en limitadas regiones geográficas. Un último estudio realizado en el año 2004 en el País Vasco sugirió la presencia de nuevos genotipos para ambos parásitos, ya que éstos presentaban un porcentaje de similitud más bajo con los ya descritos anteriormente. El objetivo de este estudio fue investigar la presencia y distribución geográfica de los distintos genotipos de *T. equi* y *B. caballi* que circulan actualmente por todo el territorio nacional. Un total de 100 muestras, derivadas de las 740 examinadas en el estudio 2, se eligieron para el análisis del gen 18S rRNA mediante una PCR anidada debido a la elevada carga parasitaria ($Cq < 35$) presente en las mismas. Los productos de PCR resultantes se secuenciaron y la diversidad genética fue analizada mediante la construcción de dos árboles filogenéticos. Por otro

lado, se evaluó una posible asociación entre los genotipos encontrados y varios factores epidemiológicos relativos a los individuos estudiados mediante la ejecución de modelos de regresión logística.

La secuenciación y el estudio filogenético de los amplicones generados identificaron 77 secuencias como *T. equi* y 6 como *B. caballi*. Las secuencias de *T. equi* se agruparon dentro de los genotipos A ($n = 21/77$), D ($n = 1/77$) y E ($n = 55/77$), mientras que las de *B. caballi* correspondieron a los genotipos A ($n = 5/6$) y B ($n = 1/6$). En el caso de *T. equi*, el genotipo E mostró una mayor diversidad entre las secuencias (97.3 - 98.3% identidad) en comparación con la encontrada en el genotipo A (99.7 - 100% identidad); sin embargo, todas las secuencias incluidas en el genotipo A de *B. caballi* fueron 100% idénticas. En cuanto a la distribución geográfica de las secuencias, el genotipo E de *T. equi* fue detectado en todas las CCAA estudiadas, mientras que el genotipo A se localizó en la zona centro y sur. Estos resultados podrían sugerir un primer asentamiento del genotipo E en España, seguido de una entrada y actual expansión del genotipo A debido al movimiento nacional de los caballos. El genotipo A de *B. caballi* solo se encontró en regiones del norte. Los genotipos D (*T. equi*) y B (*B. caballi*), localizados en Asturias y Córdoba, respectivamente, fueron identificados por primera vez en España. Debido al bajo número de secuencias obtenidas de *B. caballi*, el modelo estadístico solo se realizó teniendo en cuenta los genotipos encontrados de *T. equi*, indicando que los caballos localizados en el norte de España son más propensos a estar infectados por el genotipo E ($p = 0.01$), hecho que podría estar relacionado con una posible afinidad de las especies de garrapatas por determinados genotipos.

Este estudio demuestra la existencia de una alta heterogeneidad para ambos piroplasmas equinos en toda España, sugiriendo la necesidad de implantar medidas para controlar el movimiento de caballos entre países endémicos, lo que evitaría la entrada de nuevos genotipos a nuestro país. Además, sería interesante realizar una encuesta nacional sobre la distribución de garrapatas ixódidas para la identificación de cualquier asociación entre las distintas especies de garrapatas y el genotipo del parásito.



Contents lists available at ScienceDirect

Ticks and Tick-borne Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tbdis

Phylogenetic analysis and geographical distribution of *Theileria equi* and *Babesia caballi* sequences from horses residing in Spain

Eliazar Camino^{a,b,*}, Fatima Cruz-Lopez^a, Lucia de Juan^{a,b}, Lucas Dominguez^{a,b}, Brian Shields^c, Robert M Coultous^c

^a VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense, Madrid, Spain

^b Animal Health Department, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain

^c Institute of Biodiversity Animal Health and Comparative Medicine, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, United Kingdom

ARTICLE INFO

Keywords:
Piroplasmosis
Horses
nPCR
Genotypes
Spain

ABSTRACT

The intraerythrocytic protozoans *Theileria equi* and *Babesia caballi* are the causative agents of equine piroplasmosis (EP), one of the most important equine tick-borne diseases due to its significant impact on global international horse trade. Although EP is known to be endemic in Spain, previous phylogenetic studies have only been conducted for limited geographical regions. Therefore, the objective of this study was to evaluate the genetic diversity and distribution of these parasite species nationwide. This was performed by amplification of the 18S small subunit (SSU) rRNA gene from 100 EP positive equine blood samples using a nested PCR protocol, and sequencing the obtained amplicons. Seventy-seven *T. equi* and six *B. caballi* isolates were successfully sequenced and phylogenetic analysis revealed that the *T. equi* isolates grouped into the previously described clades A (n = 21/77), D (n = 1/77) and E (n = 55/77), while *B. caballi* isolates were placed into clades A (n = 5/6) and B (n = 1/6). Isolates from *T. equi* clade D and *B. caballi* clade B have not previously been reported in Spain. A greater intra-clade diversity (97.3–98.3 % identity) was observed between *T. equi* clade E isolates compared to those within clade A (99.7–100 % identity). Additionally, a multivariable logistic regression model was used to analyse associations between the clade of *T. equi* infection and available epidemiological data. Horses residing in Spanish northern regions were statistically more likely to be infected with *T. equi* clade E (p = 0.01). We conclude that while extensive sequence variation of equine piroplasms exists in Spanish infected horses, a requirement for increased equine movement controls between Spain and EP-endemic countries should be considered.

1. Introduction

Theileria equi and *Babesia caballi* are the primary pathogens of the intra-erythrocytic Apicomplexan parasitic disease, equine piroplasmosis (EP) (Wise et al., 2014). Natural transmission of EP occurs via specific ixodid tick vectors (Scoles and Ueti, 2015), of which *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor* and *Rhipicephalus* species have been described in Spain (Nagore et al., 2004), although iatrogenic infection through the use of contaminated hypodermic needles or blood transfusions is also possible (Short et al., 2012).

EP is widespread worldwide and is of great economic importance to the Spanish equine industry (Camino et al., 2019b), not just due to the impact of acute clinical disease, but also because chronically infected horses often become asymptomatic carriers, a status that limits their movement to EP-free countries (Dewaai, 1992; Friedhoff et al., 1990).

Both *T. equi* and *B. caballi* cause similar clinical signs (Wise et al., 2014), although a recent survey of Spanish EP cases indicated a greater severity of anaemia associated with *B. caballi* infection (Camino et al., 2019a).

Phylogenetic analysis based on 18S SSU rRNA gene sequences has revealed the presence of multiple genotypes that segregate in up to five gene clades (A, B, C, D and E) within *T. equi* (Qablan et al., 2013, 2012), and three gene clades (A, B and C) within *B. caballi* (Qablan et al., 2013). Recent work has also indicated the presence of a new species, *Theileria haneyi*, within clade C of the current *T. equi* umbrella (Knowles et al., 2018), suggesting that the observed genetic diversity may represent more than intra-species clade multiplicity.

At present, there have been limited reports describing the genetic diversity of EP in Spain. Previously, Nagore et al. (2004) described the presence of two *T. equi* and two *B. caballi* genotypes in isolates from

* Corresponding author at: VISAVET Health Surveillance Centre, Universidad Complutense, Madrid, Spain.
E-mail address: eliazar.camino@ucm.es (E. Camino).

<https://doi.org/10.1016/j.tbdis.2020.101521>

Received 14 February 2020; Received in revised form 13 July 2020; Accepted 23 July 2020

Available online 29 July 2020

1877-959X/ © 2020 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Spanish horses. One isolate from each parasite species showed a high degree of identity with previously described Spanish *T. equi* (Criado-Fornelio et al., 2003b), and *B. caballi* (Allsopp et al., 1994) isolates. However, the other *T. equi* and *B. caballi* isolates demonstrated greater genetic diversity (96.8 and 97.4 % identity respectively) which suggested the presence of novel genotypes (Criado-Fornelio et al., 2004). Therefore, the main goals of this study were (1) investigate the presence of *T. equi* and *B. caballi* clades currently in Spain, (2) describe the distribution of parasite clades within the country and (3) evaluate any potential epidemiological factors associated with detected species' clades.

2. Materials and methods

2.1. Sampling procedures

A total of 100 samples were selected from a larger set of 740 equine blood samples, submitted by private veterinarians from asymptomatic horses across Spain as part of a national EP prevalence survey (unpublished data). This sub-set of 100 samples was selected based on having strongly detectable parasite DNA (< 35 quantification cycles (C_q)) when screened by a previously described multiplex real-time PCR using primers and TaqMan probes to specifically amplify the V4 hypervariable region of the 18S rRNA gene of *T. equi* and *B. caballi* (Camino et al., 2019a). Genomic DNA was extracted from whole blood samples using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Spain) and stored at -40°C until analysis. A questionnaire to provide basic epidemiological data was completed by the submitting veterinarian from each sampled horse, including information regarding gender, age, breed, aptitude (purpose of use), geographical residence, tick presence at sampling and any history of de-worming or vaccination.

2.2. Nested PCR

All 100 DNA extractions were analysed by means of a *Theileria/Babesia* species catch-all nested PCR to amplifying a portion of the hypervariable V4 region of the 18S SSU rRNA gene. Outer (BT1-F and BTH-1R) and inner (RLB-F2 and RLB-R2) primers were described in Criado-Fornelio et al. (2003a) and Oura et al. (2004) respectively, and the reaction conditions and PCR product visualization were conducted as described by Coultous et al. (2019a).

2.3. Purification and sequencing of PCR amplified products

PCR amplicons were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Spain), before being sent to Eurofins Genomics (Germany) for Sanger sequencing.

2.4. Phylogenetic analysis

Species identification of sequences obtained in this study was achieved using the basic local alignment search tool (BLAST) and comparison with sequences deposited in the non-redundant National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). The MUSCLE function (Edgar, 2004), within the AliView alignment viewer and editor (Larsson, 2014), was used to compare the study sequences with those previously determined and deposited in GenBank for *T. equi* and *B. caballi*.

In order to assess the genetic diversity of both haemoparasites within the study samples, two species specific maximum likelihood phylogenetic trees were constructed using MEGA 7.0.26 software (Kumar et al., 2016). The 18S SSU rRNA gene sequences of *Theileria parva* (L02366) and *Theileria annulata* (KX375830) were included in the trees as outgroups. All sequences generated in this study were submitted to the NCBI GenBank database (accession numbers MN818861-MN818863 inclusive and MT563458-MT563531 inclusive for *T. equi*

isolates; accession numbers MN818859, MN818860 and MT563454-MT563457 inclusive for *B. caballi*).

2.5. Statistical analyses

Potential associations between horse epidemiological data and phylogenetic groups were evaluated by means of a multivariable logistic regression model using the software Small STATA version 12.0, with consideration of the odds ratios (ORs) and their corresponding 95 % confidence intervals (CIs). To construct the model, epidemiological data were considered as individual variables and classified in several categories: sex (male/female), age (1-7/8-15/16-26 years), breed (Iberian/cross-breed/Central-European), aptitude (breeding/sport), geographical residence (north/south of Spain), presence of ticks on the horse (yes/no), deworming (previous treatment/never treated) and vaccination programme application (previous vaccination/no vaccination). The initial model contained all variables showing $p < 0.25$ in the univariable screening analysis along with confounders (sex, breed, age and aptitude). The final model was constructed by retaining the variables with $p < 0.05$ or where their removal resulted in a significant change in the effect of other variables, indicating confounding. Collinearity between variables was checked and excluded. Biologically plausible first-order interactions were determined between significant and confounders variables. Finally, the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve and the Hosmer-Lemeshow goodness-of-fit test were calculated to evaluate fitting of the proposed model (Hosmer and Lemeshow, 2000).

3. Results

3.1. EP detection by nested PCR

Nested PCR product was successfully generated and EP specific amplicons from 83 of the 100 samples sequenced. Only a single parasite species was detected in each sample.

3.2. Phylogenetic analysis of *T. equi* 18S rRNA gene

In total, 77 samples produced sequences identified as *T. equi*, and these were partitioned into three different clades (A, D and E). A representative sequence for each distinct *T. equi* clade detected in this study (accession numbers MN818861, MN818862 and MN818863) was selected to demonstrate this phylogenetic positioning (Fig. 1). The sequences that clustered within clade A (27.3 %, $n = 21/77$) shared 99.7%-100% identity to each other (representative sequence MN818862). These sequences showed high identity (99.5-100 %) to those from previous studies in Spain (AY150062.2-AY150064.2) (Criado-Fornelio et al., 2003b), and grouped with sequences derived from samples isolated in South Africa, Brazil, Jordan and USA. Sequences clustering in clade E (71.4 %, $n = 55/77$) demonstrated 97.3-98.3 % identity to each other (representative sequence MN818861), and showed high identity (99.5-100 %) with previous sequences from Spanish isolates (AY534882.1 and DQ287951.1) (Nagore et al., 2004; Criado et al., 2006), as well as isolates from China, Korea, Mongolia, Saudi Arabia and Switzerland. Notably, only one sequence obtained clustered in clade D (MN818863). This clade has not been previously reported in Spanish samples, and grouped with isolates obtained from Turkey, Palestine, Israel and Sudan. An alignment of all *T. equi* isolates sequenced in this study is available in Appendix A.

3.3. Phylogenetic analysis of *B. caballi* 18S rRNA gene

Six *B. caballi* isolates were successfully sequenced in total, and these were distributed across two of the three previously described *B. caballi* clades, with the positioning demonstrated with a representative sample from each clade (Fig. 2). Five isolates (representative sequence

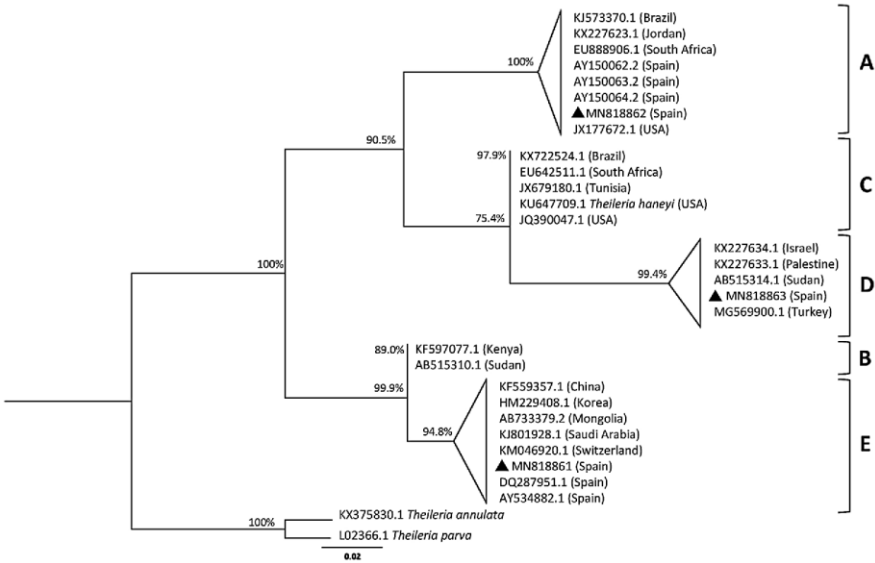


Fig. 1. A maximum likelihood tree of *Theileria equi* isolates based on sequences derived from the amplified 18S SSU rRNA V4 hypervariable region; *Theileria equi* sequences reported previously are denoted by GenBank accession number and country of isolation. Bold triangles refer to sequences obtained from the present study. Numbers above the branches correspond to bootstrap values (1000 replications). Previously described clades (A-E) are highlighted.

MN818860 clustered within clade A, showing 100 % identity to each other and a previously reported *B. caballi* isolate from Spain (AY309955.1) (Criado-Fornelio et al., 2004), and displayed high identity (99.7 %) to another sequence previously reported for a Spanish isolate (AY534883.1) (Nagore et al., 2004). This clade also contains isolates in China, Mongolia, South Africa and Italy. Only one isolate (MN818859) was clustered within a second clade, clade B, and showed high identity (97.9–100 %) to sequences of isolates from Israel, South Africa and Italy, but not with any previously reported Spanish *B. caballi* isolates. An alignment of all *B. caballi* isolates sequenced in this study is available in Appendix B.

3.4. Geographic distribution of the isolates and epidemiological data analyses

The samples in this study were collected from 12 of Spain's 17 autonomous communities; *Theileria equi* was detected in all the autonomous communities studied, but *B. caballi* was only detected in four communities (Table 1).

Fig. 3 shows the geographic distribution of the detected parasite species and their representative clade types. The *T. equi* isolates grouped in clade E were present in all the sampled communities, however clade A parasites appear to be more restricted to central and southern communities. The singular *T. equi* isolate belonging to clade D was identified in Asturias, in the north of the country. Within the *B.*

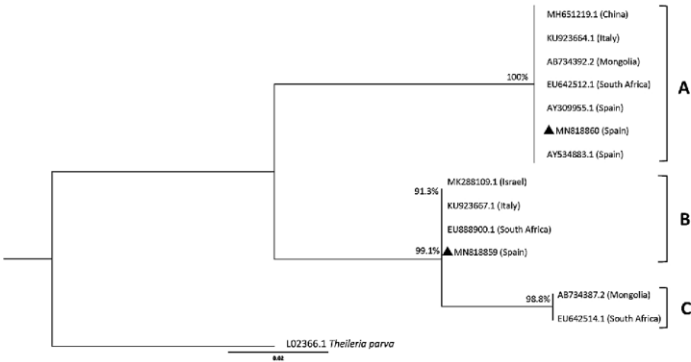


Fig. 2. A maximum likelihood tree of *Babesia caballi* isolates based on sequences derived from the amplified 18S SSU rRNA V4 hypervariable region; *Babesia caballi* sequences reported previously are denoted by GenBank accession number and country of isolation. Bold triangles refer to sequences obtained in the present study. Numbers above the branches correspond to bootstrap values (1000 replications). Previously described clades (A-C) are highlighted.

Table 1

A breakdown by community of the total number of samples analysed, and the parasite clades detected. Community abbreviations correlate with those displayed in Fig. 3.

Communities	Abbreviation	Number of samples analysed	<i>T. equi</i> -clade	<i>B. caballi</i> -clade
North				
Asturias	AS	17	D, E	A
Basque Country	BC	4	E	–
Cantabria	CA	12	E	A
Castile and Leon	CL	16	A, E	A
Catalonia	CT	2	E	–
Galicia	GA	4	E	–
Madrid	MA	9	A, E	–
Navarre	NA	6	E	–
South				
Andalusia	AN	22	A, E	B
Canary Islands	CN	1	E	–
Extremadura	EX	5	A, E	–
Valencia	VA	2	E	–

caballi isolates, all clade A sequences were only found in northern communities, whereas the single clade B isolate was detected in the far south in Andalusia.

Multivariable logistic regression analysis was performed to assess the statistical significance between *T. equi* clade and available epidemiological data. Since a clade D genotype was only represented by a single isolate, only clades A and E were considered in the analysis. The Hosmer–Lemeshow goodness-of-fit test indicated that the multivariable logistic regression analysis fitted the data adequately ($p = 0.38$). The area under the ROC curve was 0.86 (95 % CI 0.77 to 0.96), indicating that the model had good overall predictive power. Location of residence was the only variable significantly associated with the distribution of clade types ($p = 0.01$). Thus, *T. equi* clade E was 5.6 times more likely to be detected in horses located in the north of Spain (OR = 5.6, 95 % CI 1.50–21.22). Furthermore, a positive association, although not statistically significant, was identified between sport horses and clade E

type infection ($p = 0.07$; OR = 3.70, 95 % 0.89–15.41). No statistical association was found between clade group and other variables tested: sex, age, breed, aptitude, presence of ticks on the horse, deworming and vaccination programme application.

The low number of *B. caballi* isolates obtained prevented meaningful statistical analyses of the sequences derived from these samples.

4. Discussion

This study set out to investigate the diversity and distribution of parasites that cause equine piroplasmosis in Spain. The large proportion of *T. equi* isolates compared to *B. caballi* isolates that were detected in the current study confirmed *T. equi* as the predominant EP parasite in Spain. This matches findings from other EP-endemic European countries such as Italy (Manna et al., 2018), France (Guidi et al., 2015) and Portugal (Ribeiro et al., 2013), as well as the situation seen in non-endemic European countries such as the UK (Coutous et al., 2019a). Although *T. equi* was overwhelmingly predominant in this study, it should be noted that for *B. caballi* natural recovery is possible, compared to the life-long asymptomatic carriers seen with *T. equi* infection, where parasitemia peaks may recrudescence in times of stress or immunocompromise (Bruning, 1996). Therefore, *B. caballi* infections are more difficult to detect in asymptomatic horses, so the real occurrence in Spain may be underrepresented in this study.

Although equi merozoite antigen (EMA-1), rhoptry associated protein (RAP-1), β -tubulin and mitochondrial cytochrome B (cytB) genes have been targeted by PCR to diagnose EP (Battsetseg et al., 2002; Montes Cortes et al., 2019; Nicolaiewsky et al., 2001), the 18S SSU rRNA gene is the most appropriate target for piroplasm identification and genetic variation analysis, primarily due to a level of sequence conservation that allows meaningful phylogenetic comparisons, and the occurrence of multiple copies within the genome (Allsopp and Allsopp, 2006; Hunfeld et al., 2008). Early studies of EP phylogeny based on this gene initially identified only two genotypes for both equine piroplasms (Nagore et al., 2004). However, further studies rapidly established the current systems of three clades for *B. caballi* (A–C), and five clades for *T.*

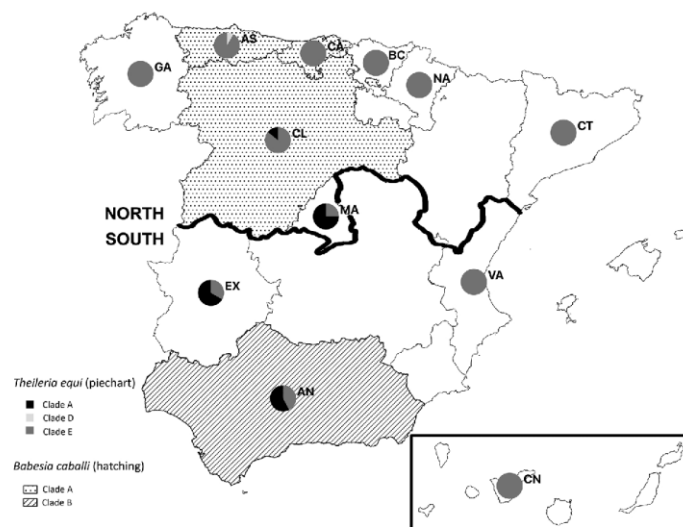


Fig. 3. The geographic distribution of *Theileria equi* and *Babesia caballi* clade types within the sampled communities across Spain. The abbreviations of the autonomous communities are expanded in Table 1.

equi (A–E) (Bhoora et al., 2009; Qablan et al., 2013; Salim et al., 2010), although recent authors have suggested combining *T. equi* clades B and E to give a four clade system (Hall et al., 2013; Alanazi et al., 2014; Coultous et al., 2019b). The present report indicates high heterogeneity for both hemoparasites across Spain, with the identification of isolates from three *T. equi* clades (A, D and E) and two *B. caballi* clades (A and B). This genetic variability among the *T. equi* and *B. caballi* 18S SSU rRNA sequences has been observed in previous studies performed in European (Criado-Fornelio et al., 2004; Manna et al., 2018) and non-European countries (Bhoora et al., 2009; Campos et al., 2019).

The majority of *T. equi* sequences were derived from clade E, showing a relatively higher genetic diversity (97.3–98.3 % identity) between sequences compared to those isolates placed in clade A (99.7–100 % identity). Both these clades have been previously described in Spain (Criado et al., 2006; Criado-Fornelio et al., 2003a; Nagore et al., 2004). As genetic diversity will have occurred over time due to recombination or SNPs within the genome (Mans et al., 2011), the greater sequence diversity of clade E samples, combined with their greater geographical distribution, may suggest that parasites within this clade could be related to the original EP strain that became endemic in Spain. *Theileria equi* clade E has been notably linked to Asian countries (Alanazi et al., 2014; Munkhjargal et al., 2013; Tian et al., 2013), but has also previously been described in Europe (Liu et al., 2016). A different situation is observed in the Americas, where a predominance of clade A isolates, and absence of clade E isolates, has been reported in studies carried out in North America (Hall et al., 2013) and Brazil (Peckle et al., 2018). An absence of clade E isolates has also been reported in southern and western Africa (Bhoora et al., 2009; Coultous et al., 2019b) and the Middle-East (Ketter-Ratzon et al., 2017).

Interestingly, Criado-Fornelio et al. (2003a) previously reported PCR detection of a *T. equi* clade A isolate from an asymptomatic Spanish dog (AY150064.2), suggesting a reduced host specificity of the piroplasm. However, this finding has been directly criticized by Uilenberg et al. (2018), arguing that a current trend of over-reliance on highly sensitive PCR detection methods may simply be detecting the transient presence of the parasite in a dead-end host; after all evidence of parasite detection is not evidence of reservoir host competence, but may indicate a degree of host persistence.

The present study is the first to report a *T. equi* clade D isolate from Spain. This clade was first reported in horses in Sudan (Salim et al., 2010), and later described in Tunisia (Ros-García et al., 2013), Israel (Ketter-Ratzon et al., 2017) and Turkey (Ozbek and Aktas, 2018). The known movement of horses between African countries and Spain via Morocco has been cited as a potential route for EP strain introduction (Salim et al., 2010), and may explain the route of incursion for the isolate detected in this study.

Previous Spanish studies have only reported *B. caballi* isolates from the currently defined clade A (Criado-Fornelio et al., 2004; Nagore et al., 2004). Our results have revealed the existence of two *B. caballi* clades: clade A as the predominant genotype, and a single previously unreported clade B isolate. The novel presence of this clade may indicate increased incursion of *B. caballi* in the Spanish horse population, as suggested by our previous work (Camino et al., 2019b). Most likely, incursion occurs as a result of the introduction of asymptomatic carriers, as freedom from piroplasmiasis is not a requirement when moving horses within the European Union (EU Directive 2009/156/CE).

Although only a single piroplasmid species was identified in each sample in our study, the detection of co-infected animals was not a study goal, and their existence cannot be discounted with our methods. Equally, the presence of mixed clade infections within single samples, or indeed the presence of undetected genotypes, cannot be ruled out. Such investigation would require additional cloning of the generated amplicons, or further molecular screening, for example using species or clade-specific probes (Coultous et al., 2019b).

Widespread distribution of *T. equi* clade E throughout Spain was demonstrated, a result that agrees with the findings of previous work

(Criado et al., 2006). In contrast, a more restricted geographic distribution of *T. equi* clade A was observed with these parasites detected in just four communities (Andalusia, Castile and Leon, Extremadura and Madrid) in central and southern Spain. This geographic division was shown to be statistically significant with horses residing in Spanish northern regions more likely to be infected with *T. equi* clade E genotypes ($p = 0.01$). Clade A also had greatest occurrence in the community of Madrid, home to the country's capital, which has a higher risk of infectious disease transmission due to the frequent movement of horses for trade and equestrian competitions (Camino et al., 2018). Due to the high trafficking of horses in this region, it is possible that clade A was first introduced through this region, and subsequently spread to neighboring regions as a result of the continued national movement of horses. However, further investigation of the isolates with additional markers and epidemiological modeling would be required to fully investigate this hypothesis.

To evaluate whether any of the *T. equi* clades detected present a particular risk of disease to horses in Spain we tested for association of clade type with a number of risk factors. A previous study by Manna et al. (2018) reported a statistical correlation between horse clinical status (symptomatic and asymptomatic) and the phylogenetic clades, suggesting that clade A is more associated with horses showing clinical signs. In our study, no statistically significant correlations were obtained relating to biological parameters of the horses (sex, age or breed), or the management associated factors of vaccination, deworming and tick presence. However, our results did show that infections associated with *T. equi* clade E are more likely to be found in horses residing in northern regions. This might be related to the species of tick vectors endemic to these regions, as speculated by previously (Hall et al., 2013). However, no studies have been carried out to date recording the distribution of tick vectors in Spain, or the possible affinity of different *T. equi* competent tick species for certain parasite genotypes. Additionally, the model suggested a trend ($p = 0.07$) for clade E to be more associated with sport horses than breeding animals, a result which could be explained by the frequent trips of sport horses to national competitions and the widespread distribution of clade E parasites throughout the country.

5. Conclusions

This is the first study to assess the genetic diversity of equine piroplasmid isolates circulating within the national horse population of Spain. Our results indicate the presence of *T. equi* and *B. caballi* clades previously described in other limited Spanish studies, as well as identifying new circulating *T. equi* and *B. caballi* genotypes. These newly identified genotypes are likely a consequence of the currently uncontrolled equine movement between EP-endemic countries and Spain. Following multivariable logistic regression analysis, *T. equi* clade E was significantly more associated with Spanish northern regions, with clade A having a more restricted geographic distribution in the south of the country. Further large-scale epidemiological studies of EP in Spain are recommended to investigate risk factors association with the different parasite genotypes and whether the horse population is at risk from incursion of parasites from clades that are not regionally common. Additionally, a national survey of tick vector distribution would be beneficial for identification of any association between parasite genotype and tick species. The currently identified genetic diversity in both *T. equi* and *B. caballi* will help to further inform both clinicians, horse owners and government officials in the selection of appropriate diagnostic tools for the detection of infected carrier horses, helping to reduce the future risk of introducing new genotypes into parasite free or endemic regions of Spain.

Funding

Eliázar Camino was supported by the Grants for Predoctoral

Researchers of the Complutense University of Madrid (CT27/16). Robert Coutous at the University of Glasgow is currently supported by a Horserace Betting Levy Board (HBLB) research fellowship (VET/EPDF/2019–1).

Animal welfare

This study was exempt from undergoing the Ethical Committee of the Veterinary Faculty, Universidad Complutense, Madrid. However, all the owners from the horses included in the study received an information sheet with the details of the study and signed an informed consent for the collection and use of the blood sample.

CRedit authorship contribution statement

Eliazar Camino: Conceptualization, Data curation, Methodology, Resources, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Fatima Cruz-Lopez:** Investigation, Resources, Supervision, Validation, Writing - review & editing. **Lucia de Juan:** Investigation, Resources, Funding acquisition, Writing - review & editing. **Lucas Dominguez:** Investigation, Resources. **Brian Shiels:** Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Resources, Validation, Writing - review & editing. **Robert M Coutous:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources, Supervision, Validation, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest in the subject, matter or materials discussed in this manuscript.

Acknowledgments

We are grateful to all the veterinary surgeons and stud farm owners that participated in this study.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101521>.

References

- Alanazi, A.D., Said, A.E., Morin-Adeline, V., Alyousif, M.S., Slapeta, J., 2014. Quantitative PCR detection of *Theileria equi* using laboratory workflows to detect asymptomatic persistently infected horses. *Vet. Parasitol.* 206, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.09.019>.
- Allsopp, M.T.E.P., Allsopp, B.A., 2006. Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1081, 509–517. <https://doi.org/10.1196/annals.1373.076>.
- Allsopp, M.T., Cavalier-Smith, T., De Waal, D.T., Allsopp, B.A., 1994. Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitology* 108 (Pt 2), 147–152. <https://doi.org/10.1017/S0031182000068232>.
- Battsetseg, B., Lucero, S., Xuan, X., Claveria, F.G., Inoue, N., Alhassan, A., Kanno, T., Igarashi, I., Nagasawa, H., Mikami, T., Fujisaki, K., 2002. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.* 107, 351–357. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00131-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00131-0).
- Bhooms, R., Franssen, L., Oosthuizen, M.C., Guthrie, A.J., Zwegers, E., Penzhorn, B.L., Jongejans, P., Collins, N.E., 2009. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. *Vet. Parasitol.* 159, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.004>.
- Bruning, A., 1996. Equine piroplasmosis: an update on diagnosis, treatment and prevention. *Br. Vet. J.* 152, 139–151. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(96\)80070-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(96)80070-4).
- Camino, E., de la Cruz, M.L., Dominguez, L., Carvajal, K.A., Fores, P., de Juan, L., 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. *J. Equine Vet. Sci.* 67, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.03.012>.
- Camino, E., Dorrego, A., Carvajal, K.A., Buendia-Andres, A., de Juan, L., Dominguez, L., Cruz-Lopez, F., 2019a. Serological, molecular and hematological diagnosis in horses with clinical suspicion of equine piroplasmosis: pooling strengths. *Vet. Parasitol.* 275, 108928. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108928>.
- Camino, E., Pozo, P., Dorrego, A., Carvajal, K.A., Buendia, A., Gonzalez, S., de Juan, L., Dominguez, L., Cruz-Lopez, F., 2019b. Importance of equine piroplasmosis antibody presence in Spanish horses prior to export. *Ticks Tick. Dis.*, 101329. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101329>.
- Campos, J.B.V., Andre, M.R., Gonçalves, L.R., Freschi, C.R., Santos, F.M., de Oliveira, C.E., Piranda, E.M., de Andrade, G.B., Macedo, G.C., Machado, R.Z., Herrera, H.M., 2019. Assessment of equine piroplasmids in the Nhecolândia sub-region of Brazilian Pantanal wetland using serological, parasitological, molecular, and hematological approaches. *Ticks Tick. Dis.* 10, 714–721. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.03.002>.
- Coutous, R.M., Phipps, P., Dalley, C., Lewis, J., Hammond, T.A., Shiels, B.R., Weir, W., Sutton, D.G.M., 2019a. Equine piroplasmosis status in the UK: an assessment of laboratory diagnostic submissions and techniques. *Vet. Rec.* 184, 95. <https://doi.org/10.1136/vr.104855>.
- Coutous, R.M., McDonald, M., Raftery, A.G., Shiels, B.R., Sutton, D.G.M., Weir, W., 2019b. Analysis of *Theileria equi* diversity in the Gambia using a novel genotyping method. *Transbound. Emerg. Dis.* 53, 385. <https://doi.org/10.1111/tbed.13454>.
- Criado, A., Martinez, J., Buling, A., Barba, J.C., Merino, S., Jefferies, R., Irwin, P.J., 2006. New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. *Vet. Parasitol.* 142, 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.004>.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Sarana, A., Barba-Carretero, J.C., 2003a. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. *Vet. Parasitol.* 113, 189–201. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00079-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00079-5).
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Sarana, A., Barba-Carretero, J.C., 2003b. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Vet. Parasitol.* 114, 173–194. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00141-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00141-9).
- Criado-Fornelio, A., Gonzalez-del-Rio, M.A., Buling-Sarana, A., Barba-Carretero, J.C., 2004. The "expanding universe" of piroplasms. *Vet. Parasitol.* 119, 337–345. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.11.015>.
- DeWaal, D.T., 1992. Equine piroplasmosis - a review. *Brit Vet J* 148, 6–14. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(92\)90061-5](https://doi.org/10.1016/0007-1935(92)90061-5).
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32 (5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
- Friedhoff, K.T., Tenter, A.M., Muller, L., 1990. Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. *Rev Sci Tech* 9, 1187–1194. <https://doi.org/10.20506/rst.9.4.535>.
- Guidi, E., Pradier, S., Lebert, I., Leblond, A., 2015. Piroplasmosis in an endemic area: analysis of the risk factors and their implications in the control of Theileriosis and Babesiosis in horses. *Parasit Res* 114 (1), 71–83. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4161-9>.
- Hall, C.M., Busch, J.D., Scoles, G.A., Palma-Cagle, K.A., Ueti, M.W., Kappmeyer, L.S., Wagner, D.M., 2013. Genetic characterization of *Theileria equi* infecting horses in North America: evidence for a limited source of U.S. introductions. *Parasit. Vectors* 6, 35. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-35>.
- Hosmer, D.W., Lemeshow, S., 2000. *Applied Logistic Regression*, second ed. Wiley Interscience Press, New York, USA, pp. 143–188.
- Hunfeld, K.P., Hildebrandt, A., Gray, J.S., 2008. Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *Int. J. Parasitol.* 38, 1219–1237. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.001>.
- Ketter-Ratzon, D., Tirosh-Levy, S., Nachum-Biala, Y., Saar, T., Qura'n, L., Zivotosky, D., Abdeen, Z., Baneth, G., Steinman, A., 2017. Characterization of *Theileria equi* genotypes in horses in Israel, the Palestinian Authority and Jordan. *Ticks Tick Borne Dis* 8, 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.02.010>.
- Knowles, D.P., Kappmeyer, L.S., Haney, D., Herndon, D.R., Fry, L.M., Munro, J.B., Sears, K., Ueti, M.W., Wise, L.N., Silva, M., Schneider, D.A., Grause, J., White, S.N., Tretina, K., Bishop, R.P., Olongo, D.O., Peizel-McCluskey, A.M., Scoles, G.A., Mealey, R.H., Silva, J.C., 2018. Discovery of a novel species, *Theileria hameyi* n. sp., infective to equids, highlights exceptional genomic diversity within the genus *Theileria*: implications for apicomplexan parasite surveillance. *Int. J. Parasitol.* 48, 679–690. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.03.010>.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Larsson, A., 2014. AllView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* 30 (22), 3276–3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>.
- Liu, Q., Meli, M.L., Zhang, Y., Meli, T., Stim, M., Riond, B., Weibel, B., Hofmann-Lehmann, R., 2016. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene in *Theileria equi* from horses presented in Switzerland. *Vet. Parasitol.* 221, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.03.003>.
- Manna, G., Cersini, A., Nardini, R., Bartolome Del Pino, L.E., Antognetti, V., Zini, M., Conti, R., Lorenzetti, R., Veneziano, V., Autorino, G.L., Scicluna, M.T., 2018. Genetic diversity of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infecting horses of Central-Southern Italy and preliminary results of its correlation with clinical and serological status. *Ticks Tick Borne Dis* 9, 1212–1220. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.05.005>.
- Mans, B.J., Piensar, R., Latif, A.A., Potgieter, F.T., 2011. Diversity in the 18S SSU rRNA V4 hyper-variable region of *Theileria* spp. in Cape buffalo (*Synotus capensis*) and cattle from southern Africa. *Parasitology* 138, 766–779. <https://doi.org/10.1017/S0031182011000187>.
- Montes Cortes, M.G., Fernandez-Garcia, J.L., Habela Martinez-Estellez, M.A., 2019. A multistep PCR for detection of the equine piroplasmids *Babesia caballi* and *Theileria equi*. *Ticks Tick Borne Dis* 10, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.001>.

- 008.
- Munkhjargal, T., Sivakumar, T., Battsetseg, B., Nyamjargal, T., Aboulaila, M., Purevtseren, B., Bayarsaikhan, D., Byambaa, B., Terkawi, M.A., Yokoyama, N., Igarashi, I., 2013. Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province, Mongolia. *Inf. genetics evolution: J. mol. epidemiology evolutionary genetics inf. diseases* 16, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.02.005>.
- Nagore, D., García-Sanmartín, J., García-Pérez, A.L., Juste, R.A., Hurtado, A., 2004. Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: epidemiological survey and phylogenetic analysis. *Vet. Parasitol.* 123, 41–54. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.04.010>.
- Nicolaiwsky, T.B., Richter, M.F., Lunge, V.R., Cunha, C.W., Delagostin, O., Ikuta, N., Fonseca, A.S., da Silva, S.S., Ozaki, L.S., 2001. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.* 101, 9–21. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00471-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00471-X).
- Oura, C.A., Bishop, R.P., Wampande, E.M., Lubega, G.W., Tait, A., 2004. Application of a reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda. *Int. J. Parasitol.* 34, 603–613. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.012>.
- Ozubek, S., Aktas, M., 2018. Genetic diversity and prevalence of piroplasm species in equids from Turkey. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 59, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.08.005>.
- Peckle, M., Pires, M.S., Silva, C.B.D., Costa, R.L.D., Vitari, G.L.V., Senra, M.V.X., Dias, R.J.P., Santos, H.A., Massard, C.L., 2018. Molecular characterization of *Theileria equi* in horses from the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 9, 349–353. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.11.011>.
- Qablan, M.A., Sloboda, M., Jirku, M., Obornik, M., Dwairi, S., Amr, Z.S., Horin, P., Lukes, J., Modry, D., 2012. Quest for the piroplasms in camels: identification of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Jordanian dromedaries by PCR. *Vet. Parasitol.* 186, 456–460. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.070>.
- Qablan, M.A., Obornik, M., Petzelkova, K.J., Sloboda, M., Shudiefat, M.F., Horin, P., Lukes, J., Modry, D., 2013. Infections by *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Jordanian equids: epidemiology and genetic diversity. *Parasitology* 140, 1096–1103. <https://doi.org/10.1017/S0031182013000486>.
- Ribeiro, A.J., Cardoso, L., Maia, J.M., Coutinho, T., Cotovio, M., 2013. Prevalence of *Theileria equi*, *Babesia caballi*, and *Anaplasma phagocytophilum* in horses from the north of Portugal. *Parasit Res* 112 (7), 2611–2617. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3429-9>.
- Roe-Garcia, A., M'Ghirbi, Y., Hurtado, A., Bouattour, A., 2013. Prevalence and genetic diversity of piroplasm species in horses and ticks from Tunisia. *Infect. Genet. Evol.* 17, 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.038>.
- Salim, B., Bakheit, M.A., Kamau, J., Nakamura, I., Sugimoto, C., 2010. Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene within *Theileria equi* from horses in Sudan. *Parasitol. Res.* 106, 493–498. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1691-7>.
- Scoles, G.A., Ueti, M.W., 2015. Vector ecology of equine piroplasmosis. *Annu. Rev. Entomol.* 60 (1), 561–580. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021110>.
- Short, M.A., Clark, C.K., Harvey, J.W., Wenzlow, N., Hawkins, I.K., Allred, D.R., et al., 2012. Outbreak of equine piroplasmosis in Florida. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 240 (5), 588–595. <https://doi.org/10.2460/javma.240.5.588>.
- Tian, Z.C., Liu, G.Y., Yin, H., Luo, J.X., Guan, G.Q., Luo, J., Xie, J.R., Shen, H., Tian, M.Y., Zheng, J.F., Yuan, X.S., Wang, F.F., 2013. RPS8—a new informative DNA marker for phylogeny of *Babesia* and *Theileria* parasites in China. *PLoS One* 8, e79860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079860>.
- Uilenberg, G., Gray, J., Kahl, O., 2018. Research on Piroplasmorida and other tick-borne agents: are we going the right way? *Ticks Tick-Borne Dis* 9 (4), 860–863. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.005>.
- Wise, L.N., Peizel-McCluskey, A.M., Mealey, R.H., Knowles, D.P., 2014. Equine piroplasmosis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 30, 677–693. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.008>.

5. DISCUSIÓN

La presente tesis doctoral recoge una serie de estudios diseñados con el fin de conocer amplia y detalladamente la situación epidemiológica y la diversidad genética de los agentes causantes de la PE (*T. equi* y *B. caballi*) en las distintas CCAA que conforman España. El interés de dicho trabajo de investigación radica en la gran importancia que presenta esta enfermedad para la ganadería equina española y más concretamente para el sector de la cría de caballos P.R.E, raza equina mayoritaria en España y altamente exportada a otros países. La seropositividad a PE es una de las principales restricciones para el movimiento de caballos a países libres de esta enfermedad, provocando elevadas pérdidas económicas para la industria equina española derivadas tanto de la prohibición de entrada de los caballos al país de destino como de la inversión realizada en la cría, entrenamiento, tratamiento y de la disminución del rendimiento de los mismos.

5.1 Seroprevalencia de la PE

La estimación de la seroprevalencia de la PE se llevó a cabo en la zona centro de España en yeguas dedicadas a la cría de caballos P.R.E (artículo 1) y a nivel nacional teniendo en cuenta caballos de cualquier tipo de raza (artículo 2). El artículo 1 reveló la existencia en las yeguas de una elevada exposición a PE detectando al menos un caballo positivo en el 81.1% (95% IC 68.2-94.0) de las mismas. Este dato corrobora lo sugerido en otros estudios realizados también en el centro de España (Cruz et al., 2015; Cruz et al., 2016a; Cruz et al., 2016b), indicando la existencia de un elevado riesgo de introducción de enfermedades infecciosas equinas en dicha área debido al frecuente movimiento de los caballos con el fin tanto de su comercialización como de su participación en competiciones nacionales, la mayoría de las cuales se celebran en dicha área (Deloitte, 2013). El artículo 1 también demostró que el 24.9% (95% IC 21.3-28.6) de los caballos P.R.E presentan anticuerpos frente a la PE, resultado que contrasta con el

obtenido en el artículo 2 en el centro del país (42.5%; 95% IC 35.3-49.7) y que puede relacionarse con la inclusión en este último artículo de caballos de distintas razas y con los estrictos cuidados a los que son sometidos los caballos P.R.E con motivo del elevado valor económico de esta raza. A nivel nacional, el artículo 2 reafirmó la situación endémica de la PE existente en España al mostrar que cerca de la mitad de la población equina (42.9%; 95% IC 39.4-46.5) está o ha estado expuesta a al menos uno de los parásitos causantes de esta enfermedad.

Ambos artículos también confirman una mayor exposición a *T. equi* que a *B. caballi* (artículo 1: 22.6% vs. 4.6%; artículo 2: 35.8% vs. 15.6%) y la presencia de infecciones mixtas en un 2.0% (artículo 1) y un 8.9% (artículo 2) de los caballos. Nuestros resultados son muy similares a los encontrados en otros países del centro y sur de Europa como Hungría (Farkas et al., 2013) y Francia (Guidi et al., 2015), pero difieren de los presentados en Suiza (Sigg et al., 2010), Países Bajos (Butler et al., 2012) y Reino Unido (Coultous et al., 2019b), donde la seropositividad a PE fue mucho más baja (del 7.3%, 4.0% y 8.0%, respectivamente). El hecho de que la seroprevalencia de *T. equi* sea mayor que la de *B. caballi* está relacionado con la posible presencia de por vida de *T. equi* en la sangre, mientras que *B. caballi* es con frecuencia eliminado en un periodo de 4 años (Bruning, 1996). Además, Weiland (1986) sugirió que tras aplicar un tratamiento para combatir la PE, los anticuerpos frente a *T. equi* empezarían a disminuir a partir de los 2 años en comparación a los de *B. caballi* que lo harían en un periodo de 3 a 15 meses. Por el contrario, en países asiáticos como China (Wang et al., 2014) y Mongolia (Munkhjargal et al., 2013), y en Suramérica (Kerber et al., 2009; Rosales et al., 2013) se ha demostrado una mayor exposición a *B. caballi*, lo que puede explicarse por una mayor presencia de garrapatas transmisoras de *B. caballi* en estos territorios (Scoles and Ueti, 2015).

Por otro lado, en caballos con destino exportación (artículo 4) se encontraron unos valores de seroprevalencia de PE (24.1%; 95% IC 22.6-25.5), de *T. equi* (21.0%; 95% IC 19.6-22.4) y de *B. caballi* (5.6%; 95% IC 4.9-6.4) muy semejantes a los mostrados en el artículo 1 (PE: 24.9%, *T. equi*: 22.6%, *B. caballi*: 4.6%) lo que puede deberse a que la mayoría de los caballos sometidos a un análisis pre-exportación fueran P.R.E ya que esta raza,

además de representar el 85% de la población de caballos de raza pura residentes en España, supone prácticamente el 100% de los caballos que son exportados a otros países europeos y al continente americano (Deloitte, 2013). Sin embargo, la seroprevalencia demostrada en el artículo 4 es inferior a la encontrada en el artículo 2 (PE: 42.9%, *T. equi*: 35.8%, *B. caballi*: 15.6%) lo que puede atribuirse a que los caballos con destino exportación reciben mayor atención y mejores cuidados (alojamiento en boxes, cepillado y aplicación de acaricidas) con el objetivo de evitar la infección por *T. equi* y *B. caballi* y de esta manera favorecer su venta a otros países.

En los artículos 2 y 4 también se determinó la seroprevalencia de PE en cada una de las CCAA estudiadas revelando ambos artículos resultados muy similares. La mayor tasa de seropositividad tiene lugar en la zona norte del país (Navarra concretamente) seguida de Extremadura y Castilla y León. Por el contrario, las CCAA ubicadas en la parte Este del país junto con Castilla La Mancha y Andalucía serían las regiones con menores seroprevalencias. Las diferentes seroprevalencias encontradas en las distintas regiones españolas también se han observado en otros países y pueden deberse al manejo y cuidados de los caballos y a la mayor o menor presencia de garrapatas transmisoras, la cual está ligada a las condiciones de temperatura y humedad presentes en dichas regiones (Abutarbush et al., 2012; Sumbria et al., 2016a; Sumbria et al., 2018; Vieira et al., 2013). Por otro lado, nuestros resultados son inferiores a los mostrados en estudios publicados anteriormente en España, en los cuales se encontró una seroprevalencia del 40.0% en Galicia (Camacho et al., 2005), del 53.3% en Andalucía (García-Bocanegra et al., 2013) y del 67.5% en Castilla La Mancha (Montes Cortes et al., 2017), lo que puede atribuirse a la especie equina considerada, al número de caballos analizados y al test diagnóstico empleado para la realización de dichos estudios.

5.2 Prevalencia de la PE en caballos portadores asintomáticos

La elevada presencia de *T. equi* y *B. caballi* en nuestro país también fue demostrada en el estudio 2 ya que un 30.3% (95% IC 27.0-33.6) de los caballos censados serían portadores asintomáticos de estos parásitos equinos, pudiendo actuar como fuentes de infección de PE para las garrapatas vectores y por lo tanto para otros caballos. También se evidenció un mayor número de caballos portadores de *T. equi* (29.0%, 95% IC 25.7-32.3) que de *B. caballi* (1.8%, 95% IC 0.9-2.8) y una tasa de infección mixta del 0.7% (95% IC 0.1-1.3). La mayor detección de *T. equi* coincide con lo descrito en la mayoría de los estudios de prevalencia de PE (Davitkov et al., 2016; Elata et al., 2020; Qablan et al., 2013), siendo *B. caballi* incluso no detectado en sangre por algunos autores pese a la existencia de anticuerpos frente a dicho piroplasma (Grandi et al., 2011; Ozubek and Aktas, 2018; Rosales et al., 2013). En comparación con la frecuente permanencia de *T. equi* en la sangre, *B. caballi* puede ser eliminado de forma natural o tras la aplicación de un tratamiento (Friedhoff and Soule, 1996; Schwint et al., 2009). Este hecho, junto con su habitual localización en capilares sanguíneos y la menor carga parasitaria encontrada en infecciones debidas a este parásito, pueden explicar su baja detección por medio de ensayos moleculares (Tirosch-Levy et al., 2020c). Sin embargo, algunos factores que condicionan la sensibilidad de la prueba molecular utilizada, como el límite de detección (menor para *T. equi* que para *B. caballi* en la PCR a tiempo real desarrollada en el artículo 3) y el gen diana, también pueden influir en este resultado (Bhoora et al., 2010b; Rosales et al., 2013). Por otro lado, y por la misma razón descrita en el apartado 5.1 también se ha encontrado una prevalencia mayor de *B. caballi* en regiones de Mongolia (Munkhjargal et al., 2013) y Brasil (Braga et al., 2017).

En el artículo 2 también se determinó la prevalencia de PE en cada una de las CCAA españolas revelando, al igual que los resultados de seroprevalencia, una prevalencia muy alta en Navarra, Extremadura y Castilla y León, y un bajo número de caballos infectados en el Este del país, Castilla La Mancha y Andalucía. La prevalencia de PE descrita por Adaszek et al. (2012) en Andalucía (20.0%) es muy similar a la encontrada en nuestro estudio (29.2%); sin embargo, la prevalencia demostrada por Montes Cortes

et al. (2019) en Extremadura y Castilla y León (72.8%) es superior en comparación a la obtenida por nosotros: Extremadura (41.1%) y Castilla y León (31.1%). A diferencia de la PCR utilizada en nuestro estudio y aquella empleada por Adaszek et al. (2012), en las cuales se utilizó solo un gen diana (18S rRNA), el uso por Montes Cortes et al. (2019) de una PCR combinada (*multiplex* y anidada) y basada en siete genes diana, cuatro para la detección de *T. equi* (18S rRNA, β -tubulina, EMA-1 y cytB) y tres para *B. caballi* (18S rRNA, β -tubulina y RAP-1), podría mejorar el diagnóstico de la PE al amplificar distintos genes específicos de cada protozoo.

5.3 Factores de riesgo asociados con la seroprevalencia de la PE

Los artículos 1 y 2 evaluaron factores de riesgo asociados a la PE relativos tanto a las cualidades intrínsecas y de manejo de los propios caballos como a las características de las explotaciones de alojamiento. La identificación de dichos factores es de vital importancia para el establecimiento en las granjas de medidas eficaces que ayuden a prevenir y a controlar esta enfermedad. Ambos artículos corroboraron lo descrito por García-Bocanegra et al. (2013): los caballos adultos tienen mayor probabilidad de ser seropositivos a *T. equi*, mientras que aquellos a los que se le aplica un programa de vacunación presentan una menor seropositividad. La mayor presencia de anticuerpos frente a *T. equi* en caballos adultos refleja, además de la imposibilidad de eliminación de este parásito descrita anteriormente, una exposición a los vectores de garrapatas durante un periodo de tiempo más amplio (Kamyngkird et al., 2014). Por otro lado, los caballos vacunados frente a otras enfermedades infecciosas están normalmente sujetos a mejores condiciones de manejo, reduciéndose así su exposición a las garrapatas y, por consiguiente, la infección por PE. Nuestros resultados también demostraron una mayor probabilidad de infección por *T. equi* en caballos con presencia de garrapatas, en machos y en caballos de raza cruzada. En la mayoría de los estudios también se indica una incidencia mayor de infecciones de PE en caballos con acceso a los pastos, criados en un sistema extensivo o con una falta de cuidados

(desparasitación externa, revisión diaria y cepillado), condiciones que incrementan la exposición a las garrapatas (Dos Santos et al., 2011; Peckle et al., 2013). Sin embargo, la asociación de un sexo u otro con la incidencia de PE no está del todo clara (Dahiya et al., 2018). Los machos podrían presentar mayor seropositividad al ser sometidos a duros entrenamientos diarios produciendo un desgaste de su sistema inmune; en cambio, las hembras se suelen mantener en el campo facilitando así su contacto con las garrapatas (Shkap et al., 1998). Además, los niveles de testosterona en los machos podrían estar asociados a un aumento del parasitismo (Klein, 2004). En relación a la susceptibilidad de las razas a la PE, Bartolome Del Pino et al. (2016) también encontró una mayor seroprevalencia en caballos cruzados, y Sevinc et al. (2008) y Montes Cortes et al. (2017) en caballos árabes.

En cuanto a la infección por *B. caballi*, los factores de riesgo asociados con una mayor seropositividad a dicho agente fueron la existencia de una elevada densidad de población en las explotaciones (más de 2.500 caballos/km²), la cohabitación de los équidos con ganado vacuno y la distribución geográfica de éstos en el norte de la península ibérica. Otros autores también han evidenciado que con el contacto cercano entre los caballos y entre éstos y los rumiantes se favorece la transmisión de la PE al ser las garrapatas capaces de transmitir diversas enfermedades en otras especies animales (Heuchert et al., 1999; Ruiz-Fons et al., 2006; Vila et al., 2019). La existencia de una mayor probabilidad de encontrar un caballo positivo en determinadas regiones geográficas también ha sido descrita en otros estudios y puede estar relacionada con el tipo de clima existente en dichas zonas, el cual puede ser o no favorable para el desarrollo de los vectores (Davitkov et al., 2016; Montes Cortes et al., 2017). Por otro lado, los factores identificados como medidas de prevención frente a *B. caballi* fueron la aplicación de medidas de desinfección en las explotaciones y la asistencia a ferias y/o competiciones. Estos factores se relacionan con el hecho de que los caballos sometidos a una atención diaria y a mejores condiciones higiénico-sanitarias en las explotaciones presentan una menor exposición a los vectores (Dos Santos et al., 2011). Finalmente, también se encontró una menor seroprevalencia de *B. caballi* separando las yeguas preñadas de caballos jóvenes de 1 a 2 años de edad. Sant et al. (2016)

sugirieron que los cambios hormonales de la preñez y del parto podrían reactivar piroplasmas (*T. equi* principalmente) “secuestrados” en capilares o médula ósea y facilitar así la infección de caballos jóvenes por medio de las garrapatas.

5.4 Cambios hematológicos y bioquímicos en caballos clínicamente afectados por *T. equi* y/o *B. caballi*

Las alteraciones hemato-bioquímicas que se han descrito en el curso de la piroplasmosis equina, al igual que los signos clínicos, son variables, inespecíficas y sobre todo no patognomónicas de esta enfermedad. Por ello, en el artículo 3 se evaluaron determinados parámetros tanto hematológicos (GR, Hgb, Htc, GB y plaquetas) como bioquímicos (BT y BD) en caballos con sospecha clínica de padecer PE con el objetivo de identificar alguno de estos parámetros como biomarcadores específicos de la presencia en el torrente sanguíneo de uno u otro piroplasma equino. De forma general, nuestros resultados mostraron una disminución significativa de los niveles de GR y de Hgb en caballos positivos a PE mediante PCR, y un aumento significativo de los GB en aquellos con un diagnóstico positivo tanto por PCR como por cELISA. La existencia de anemia hemolítica ha sido descrita como la principal alteración hematológica en caballos con un PE clínica; sin embargo, en fases agudas de la enfermedad es más frecuente que los niveles de GB estén disminuidos debido a la existencia de neutropenia (Ionita et al., 2018; Mahmoud et al., 2016; Zobba et al., 2008), la cual se ha visto acentuada con la presencia adicional en sangre de una nueva especie de *Theileria* (*T. haneyi*) (Sears et al., 2019). Tras 10 días de infección tendría lugar la aparición de leucocitosis asociada a un aumento de los niveles de linfocitos (Taylor et al., 1969).

Aunque *T. equi* siempre ha sido relacionado con una mayor patogenicidad (Camacho et al., 2005; Ionita et al., 2018; Nagore et al., 2004), nuestros resultados revelaron por primera vez la aparición de una anemia más severa en caballos parasitados por *B. caballi*, mostrando estos últimos

valores significativamente más bajos de GR, Hgb y Hct. Estos individuos también presentaron una marcada trombocitopenia; hallazgo principalmente relacionado con la infección por dicho parásito (Osman, 2017; Ybanez et al., 2018) y encontrado también con frecuencia en casos de babesiosis canina (Mierzejewska et al., 2014). Por otro lado, los caballos positivos a *T. equi* únicamente mostraron valores de GB significativamente más altos que aquellos negativos. Hailat et al. (1997) también encontró valores aumentados de leucocitos en caballos con signos clínicos compatibles con PE y con una elevada parasitemia. Según Sakha (2007) e Ybanez et al. (2018) este aumento podría estar relacionado con la presencia de monocitosis y linfocitosis; alteraciones que podrían permanecer en los caballos después de superar la fase aguda de la PE. La leucocitosis asociada a la infección por *T. equi* encontrada en nuestro artículo puede deberse a la existencia en el ciclo biológico de este parásito de una etapa extraeritrocitaria que tiene lugar en las células mononucleares de sangre periférica (Mehlhorn and Schein, 1998).

En cuanto a los parámetros bioquímicos, pese a que en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas entre caballos positivos y negativos a PE, aquellos individuos positivos a PCR presentaron valores aumentados de BT. La hiperbilirrubinemia es la alteración bioquímica más frecuente, se asocia a un incremento de la bilirrubina no conjugada y es una consecuencia de la hemólisis de los eritrocitos (Zobba et al., 2008). Aunque en la presente tesis doctoral solo se han evaluado los niveles de BD y de BT sería interesante estudiar en el futuro otros cambios bioquímicos para tener mayor información acerca de la patogenia de la PE. Así, en la mayoría de los caballos con PE y debido al daño hepático producido se ha encontrado un descenso de las proteínas totales en suero (Hailat et al., 1997); sin embargo, también se ha descrito una hiperproteinemia junto con un incremento de los niveles de urea, ambos asociados a un fenómeno de deshidratación (Camacho et al., 2005; Takeet et al., 2010). Por último, esta enfermedad también ha sido relacionada con un aumento significativo de enzimas neuromusculares (AST y CK) y hepáticas (ALP, AST y GGT) como resultado de la degeneración centrolobulillar y la necrosis coagulativa de los hepatocitos, lo que causa la liberación de estas enzimas en el plasma sanguíneo (Camacho et al., 2005; Hailat et al., 1997), y un incremento del

nivel de citoquinas en respuesta del proceso inflamatorio inducido por la presencia de *T. equi* en el organismo (Mostafavi et al., 2020).

5.5 Comparación de las distintas técnicas de diagnóstico de la PE

En la actualidad existen varias técnicas para el diagnóstico laboratorial de la PE que permiten tanto la identificación de los piroplasmas equinos como la detección de la respuesta inmunitaria frente a los mismos. Teniendo en cuenta las técnicas empleadas de manera rutinaria, la identificación se puede llevar a cabo mediante la visualización de los parásitos en frotis de sangre teñidos o por medio de la detección de su material genético en una PCR; mientras que la presencia de anticuerpos frente a la PE se puede demostrar por medio de tres test serológicos: FC, IFI y cELISA.

Pese a la variedad de técnicas disponibles, no se dispone de una prueba única estandarizada que permita el diagnóstico fiable de esta enfermedad en cualquiera de sus cuatro formas clínicas (hiperaguda, aguda, subaguda o crónica) y que a su vez posibilite la diferenciación entre caballos con una exposición anterior o reciente a *T. equi* y/o *B. caballi*, individuos portadores sanos y caballos con una piroplasmosis aguda en los que no ha tenido lugar aún la producción de anticuerpos específicos. Es por esto que la OIE y la mayoría de los autores recomiendan el uso conjunto de dos o más de estas técnicas para la detección de las distintas formas clínicas mediante las cuales se puede manifestar la PE.

En los artículos 2 y 3 se evaluaron y compararon los resultados obtenidos por frotis sanguíneo, cELISA, FC y PCR a tiempo real. En caballos con una sospecha clínica de padecer PE, el examen de los frotis sanguíneos reveló un menor número de individuos positivos en comparación con los detectados por PCR. Aunque el frotis puede ser útil para el diagnóstico de la PE en fases agudas de la enfermedad, esta técnica posee varios factores limitantes como la necesidad de personal cualificado para su visualización y la posibilidad de obtención de resultados falsos negativos debido a la baja

parasitemia normalmente encontrada en la sangre, sobre todo en el caso de *B. caballi* (Wise et al., 2014). En ambos artículos, el cELISA detectó un mayor número de caballos positivos a PE, a diferencia de lo publicado por Rapoport et al. (2014) y Bhoora et al. (2010d), los cuales demostraron que las técnicas IFI y PCR eran más eficientes que el kit comercial cELISA para el diagnóstico de *B. caballi* en la población de caballos de Suráfrica e Israel debido a la diversidad genética del epítipo de RAP-1 utilizado en el cELISA.

Por otro lado, el valor del coeficiente k en ambos artículos demostró un nivel de acuerdo mayor entre las pruebas serológicas (cELISA y FC) ($k = 0.721$) que entre éstas y la PCR (cELISA/PCR: $k = 0.587$; FC/PCR: $k = 0.525$), así como una baja concordancia en el diagnóstico de infecciones causadas por *B. caballi* en comparación con *T. equi*. Montes Cortes et al. (2017) revelaron resultados similares entre las técnicas IFI y cELISA, alegando que el bajo acuerdo entre los resultados para *B. caballi* podría deberse a la utilización de distintos antígenos diana en dichos tests. La existencia de discrepancias entre los resultados de la técnica cELISA y las pruebas moleculares también han sido descritas por otros autores sugiriendo la necesidad de utilizar ambas técnicas para el diagnóstico de la PE principalmente en áreas endémicas ya que los resultados positivos por PCR sugieren la presencia de una parasitemia activa mientras que el cELISA se asocia con una infección antigua o crónica (Campos et al., 2019; Jaffer et al., 2010; Mahdy et al., 2016). Sin embargo, estas discordancias también pueden ser debidas a diferencias genéticas entre el gen diana de la PCR y las secuencias de los genes usados para diseñar las proteínas recombinantes en los kits serológicos (Montes Cortes et al., 2019). Además, la baja concordancia encontrada entre técnicas serológicas y moleculares en infecciones por *B. caballi* se debe principalmente a la posible eliminación de este parásito por el animal y al bajo porcentaje de eritrocitos parasitados por el mismo, llegando incluso a ser indetectable utilizando las pruebas moleculares (Bruning, 1996; Holman et al., 1993).

En otros estudios también se ha evaluado el porcentaje de acuerdo entre los distintos tipos de técnicas moleculares, demostrándose que la PCR a tiempo real presenta una mayor sensibilidad, especificidad y eficiencia que la PCR convencional para el diagnóstico de ambos piroplasmas (Sant et al.,

2016), que existe un alto nivel de acuerdo entre dos técnicas PCR a tiempo real (una de ellas basada en un solo gen diana y la otra en dos genes diana) (Lobanov et al., 2018) y que la técnica de amplificación isotérmica LAMP posee una mayor efectividad en el diagnóstico de infecciones tempranas que el cultivo *in vitro* y la PCR convencional debido a la utilización de cuatro cebadores dirigidos a seis secuencias distintas del ADN problema (Alhassan et al., 2007).

5.6 Diversidad genética de *T. equi* y *B. caballi* existente en España

La filogénesis de *T. equi* y *B. caballi* solo se ha estudiado en ciertas regiones geográficas de España, no existiendo información actual sobre los distintos genotipos de ambos piroplasmas que circulan por nuestro país. La realización del artículo 5 permitió la identificación de tres genotipos (A, D y E) para *T. equi* y dos (A y B) para *B. caballi* utilizando el gen 18S rRNA como diana. Los genotipos A y E de *T. equi* y el genotipo A de *B. caballi* ya habían sido detectados con anterioridad en España (Adaszek et al., 2012; Criado-Fornelio et al., 2004; Criado-Fornelio et al., 2003a; Criado et al., 2006; Nagore et al., 2004); sin embargo, en nuestro trabajo de investigación se ha descrito por primera vez la existencia de los genotipos D (*T. equi*) y B (*B. caballi*) en nuestro país. La presencia del genotipo A para ambos piroplasmas y del E para *T. equi* también había sido ya demostrada en Italia (Manna et al., 2018) y Suiza (Liu et al., 2016), respectivamente.

Las secuencias de *T. equi* incluidas en el genotipo A se agruparon con aislados procedentes de Suráfrica (Bhoora et al., 2009), Jordania (Ketter-Ratzon et al., 2017), EEUU (Hall et al., 2013) y Brasil (Peckle et al., 2013). Este genotipo es habitual en dichas áreas geográficas ya que también ha sido detectado en la India y junto con el genotipo C en Cuba (Diaz-Sanchez et al., 2018; Kumar et al., 2020). Por otro lado, las secuencias del genotipo E mostraron un elevado porcentaje de identidad con aislados procedentes de Arabia Saudí y de Asia Oriental (China, Corea, Mongolia), países en los cuales este genotipo es predominante (Alanazi et al., 2014; Munkhjargal et

al., 2013). En cuanto a *B. caballi*, las secuencias agrupadas dentro del genotipo A se clasificaron junto con aislados de Suráfrica y de Asia Oriental (Bhoora et al., 2009; Wang et al., 2019a).

Los nuevos genotipos identificados en España han sido descritos anteriormente en Italia, Suráfrica e Israel (genotipo B de *B. caballi*) (Bhoora et al., 2009; Manna et al., 2018) y en Sudán, Israel y Turquía (genotipo D de *T. equi*) (Ketter-Ratzon et al., 2017; Ozubek and Aktas, 2018), por lo que la presencia actual de éstos en nuestro país podría ser debida al movimiento no controlado de los caballos portadores asintomáticos entre países comunitarios (Directiva 2009/156/CE relativa a las condiciones de policía sanitaria que regulan los movimientos de équidos) y entre África y España a través de Marruecos (Salim et al., 2010).

En relación a la localización de estos genotipos en España, se observó una clara diferencia entre el genotipo A (área norte) y el B (área sur) de *B. caballi*. Por otro lado, el genotipo E de *T. equi* fue detectado en todas las CCAA estudiadas coincidiendo con lo sugerido por Criado et al. (2006), mientras que el genotipo A solo se observó en aquellas del centro y sur de la península. La distribución generalizada del genotipo E junto con la mayor diversidad genética encontrada entre los aislados incluidos en dicho genotipo (97.3 - 98.3% identidad) en comparación con la observada entre los aislados del genotipo A (99.7 - 100% identidad) podría sugerir un primer asentamiento del genotipo E en nuestro país, seguido de un fenómeno de recombinación dentro del genoma (Mans et al., 2011), junto con una posterior entrada del genotipo A, el cual estaría actualmente en expansión debido al movimiento nacional de los caballos. Sin embargo, para confirmar completamente esta hipótesis sería necesaria una investigación de estos aislamientos a mayor escala utilizando marcadores adicionales y modelos epidemiológicos.

5.7 Asociación de los genotipos con factores individuales y externos de los caballos

Poco se conoce sobre la existencia de una posible asociación entre los datos epidemiológicos propios de los caballos y el tipo de genotipo causante de la PE en los mismos. Este fue otro de los objetivos del artículo 5, el cual se llevó a cabo únicamente con los genotipos encontrados para *T. equi* ya que para *B. caballi* solo fue posible la secuenciación de seis aislados. Para este último piroplasma no se ha encontrado ningún tipo de asociación hasta la fecha debido principalmente al escaso número de casos clínicos producidos por el mismo (Tirosh-Levy et al., 2020c). En base a nuestro estudio, los caballos localizados en las regiones del norte de España presentaron una probabilidad de infección significativamente mayor por el genotipo E ($p = 0.01$), lo que podría estar relacionado con una mayor cantidad de garrapatas en dichas regiones debido a que el clima existente en las mismas, caracterizado por temperaturas suaves y elevada humedad, favorece el desarrollo de estos vectores (Khajuria et al., 2015). Para poder justificar esta hipótesis sería interesante conocer la distribución de las distintas especies de garrapatas transmisoras de PE en todo el territorio nacional de igual manera a lo realizado por Romiti et al. (2020) en la zona centro de Italia. Sin embargo, también podría indicar una mayor afinidad de las garrapatas del norte por el genotipo E, de forma similar a lo sugerido en un estudio publicado por Hall et al. (2013) donde la posible infección de las garrapatas por distintos genotipos de *T. equi* podría ser uno de los motivos de la diversidad genética de este parásito encontrada en el brote de PE que tuvo lugar en Texas. Nuestros resultados también revelaron, aunque de forma no significativa ($p = 0.07$), que el genotipo E es el principal responsable de la infección por *T. equi* en los caballos de deporte. No se ha determinado con anterioridad una posible relación entre los distintos genotipos y la aptitud del caballo, por lo que nuestro hallazgo podría explicarse por los frecuentes viajes de estos caballos a competiciones nacionales y la distribución generalizada del genotipo E en todo el país.

Por otro lado, sería interesante llevar a cabo en el futuro estudios que relacionen el estatus clínico del caballo con el tipo de genotipo responsable de la infección ya que varios autores han evaluado el grado de patogenicidad de los distintos genotipos. Así, la presencia del genotipo A de *T. equi* se ha asociado con la aparición de brotes clínicos de PE (Hall et al., 2013) tanto en potros (Tirosh-Levy et al., 2020a) como en caballos adultos (Manna et al., 2018; Tirosh-Levy et al., 2020c). Además, la presentación de una neutropenia mucho más marcada se ha relacionado con la infección por múltiples genotipos [genotipo A (*T. equi*) y genotipo C (*T. haneyi*)] (Sears et al., 2019). Este hallazgo según Coultous et al. (2019a) podría ser más frecuente en machos que en hembras.

6. CONCLUSIONES

1. Los valores de seroprevalencia de PE encontrados en todo el territorio nacional [42.9% (39.4-46.5)] confirman la situación endémica de esta enfermedad en España, particularmente en las explotaciones dedicadas a la cría de caballos P.R.E, observándose en un 81.1% (68.2-94.0) al menos un caballo seropositivo a *T. equi* y/o *B. caballi*.
2. Existe un elevado porcentaje de caballos portadores de *T. equi* y/o *B. caballi* asintomáticos [30.3% (27.0-33.6)] que pueden actuar como fuentes de infección para otros equinos.
3. La prevalencia de PE obtenida por cELISA y PCR varía entre las distintas CCAA españolas, siendo mayor en aquellas situadas en la zona norte de España; hecho que podría estar relacionado con una carencia de medidas de prevención y control de PE en las explotaciones y con el tipo de clima existente en dicha zona, el cual resulta favorable para la reproducción y el desarrollo de las garrapatas transmisoras de esta enfermedad.
4. Los factores de riesgo relacionados con una mayor seropositividad a PE son la presencia de garrapatas, el incremento de la edad de los caballos, las razas equinas cruzadas y el contacto cercano con ganado bovino. Por el contrario, la aplicación de un programa de vacunación frente a gripe y tétanos en los caballos y la desinfección correcta de las explotaciones son factores preventivos frente a esta enfermedad.
5. Al contrario de lo descrito por la mayoría de los autores, nuestros resultados demuestran alteraciones hematológicas más severas en los caballos parasitados por *B. caballi*, observándose trombocitopenia y valores significativamente menores de GR, Hgb y Htc que en los caballos parasitados por *T. equi*, en los que la alteración principal es la leucocitosis.

6. El análisis de ciertos parámetros hematológicos (GR, Hgb, Htc, GB y plaquetas) y bioquímicos (BT), junto con las técnicas serológicas (cELISA, FC) podrían resultar de ayuda para el diagnóstico de la PE; sin embargo, la PCR se consideraría la técnica de elección para la confirmación de la presencia de *T. equi* y *B. caballi* en el torrente sanguíneo.
7. La PE supone un problema para la industria equina española ya que el 24.1% (22.6-25.5) de los caballos sometidos a un análisis pre-exportación no van a poder ser comercializados a otros países, implicando unas pérdidas económicas anuales de 14.5 millones de euros.
8. Los resultados de los estudios filogenéticos muestran la circulación de distintos genotipos de *T. equi* (A, D y E) y *B. caballi* (A y B) en todo el territorio nacional. Las diferencias encontradas en cuanto a la distribución geográfica de estos genotipos sugieren la necesidad de profundizar en la ecología de las garrapatas trasmisoras de PE y su posible afinidad por determinados genotipos.
9. En esta tesis doctoral se pone de manifiesto un aumento significativo de casos positivos a *B. caballi* y la existencia de nuevos genotipos no descritos anteriormente en España (*T. equi*: genotipo D; *B. caballi*: genotipo B), lo cual puede deberse al movimiento, tanto nacional como intracomunitario, no controlado de équidos.
10. En nuestra opinión, el uso de acaricidas, la revisión diaria de los caballos y el establecimiento de un programa de vigilancia de la PE que incluya un chequeo serológico anual ayudarían a controlar la situación endémica que esta enfermedad presenta en España, evitando así problemas en la exportación de caballos a otros países.

7. CONCLUSIONS

1. EP seroprevalence values found nationwide [42.9% (39.4-46.5)] confirm the endemic situation of this disease in Spain, particularly in SP breeding stud farms; the 81.1% (68.2-94.0) of these farms accounted at least one seropositive horse for *T. equi* and/or *B. caballi*.
2. A considerable percentage of horses are asymptomatic carrier of *T. equi* and/or *B. caballi* [30.3% (27.0-33.6)] and may act as a source of infection for other equids.
3. The prevalence of EP obtained by both cELISA and PCR varies depending on the Spanish geographic area but seems to be greater in the northern regions. This finding could be associated with a lack of prevention and control measures for EP in farms and to the type of climate in those areas, which favours the reproduction and development of EP-transmitting ticks.
4. Risk factors related to a higher seropositivity to EP are the presence of ticks, increase in horse age, Crossbred horses and contact with cattle. In contrast, vaccination programmes against influenza and tetanus, and disinfection measures in the stud farms are factors associated with the control of this disease.
5. Conversely to the majority of authors, our results reveal horses parasitized by *B. caballi* show more severe hematological alterations (thrombocytopenia and significantly lower values of RBC, Hb and PCV) than horses parasitized by *T. equi*, in which the main alteration is leukocytosis.
6. The analysis of certain hematological (RBC, Hb, PCV, WBC and platelets) and biochemical (TB) parameters, along with serological assays (cELISA, CFT) could be helpful for the diagnosis of EP; however, PCR is the test of choice in order to confirm the presence of *T. equi* and *B. caballi* in the bloodstream.

7. EP is a problem for the Spanish equine industry since 24.1% (22.6-25.5) of horses subjected to a pre-exportation analysis cannot be exported to other countries, meaning annual economic losses around 14.5 million of euros.
8. Phylogenetic studies show the circulation of several genotypes of *T. equi* (A, D and E) and *B. caballi* (A and B) nationwide. Different geographic distribution of these genotypes was found, suggesting the need to study the ecology of EP-transmitting ticks and their possible affinity for certain genotypes.
9. This thesis demonstrates a significant increase in *B. caballi*-positive horses and the presence of new genotypes not previously reported in Spain (*T. equi*: genotype D; *B. caballi*: genotype B); this finding is possibly associated with both national and intracommunity uncontrolled movement of equids.
10. In our opinion, the use of acaricides, the daily checks for ticks in horses and the implementation of a EP surveillance program through an annual serological screening of horses could aid to control the endemic situation of this disease in Spain, avoiding problems in exportation of horses to other countries.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abutarbush, S.M., Alqawasmeh, D.M., Mukbel, R.M., Al-Majali, A.M., 2012. Equine babesiosis: seroprevalence, risk factors and comparison of different diagnostic methods in Jordan. *Transbound Emerg Dis* 59, 72-78.
- Adams, L.G., 1981. Clinicopathological aspects of imidocarb dipropionate toxicity in horses. *Res Vet Sci* 31, 54-61.
- Adaszek, L., Garcia-Bocanegra, I., Arenas-Montes, A., Carbonero, A., Arenas, A., Winiarczyk, S., 2012. Identification of piroplasms isolated from asymptomatic equine species from southern Spain. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 125, 509-512.
- AEMPS, 2019. Informe del comité de disponibilidad de medicamentos veterinarios (CODI-VET) sobre vacíos terapéuticos y otras necesidades prioritarias. <https://www.aemps.gob.es/informa/informe-del-comite-de-disponibilidad-de-medicamentos-veterinarios-codi-vet-sobre-vacios-terapeuticos-y-otras-necesidades-prioritarias/>
- Aharonson-Raz, K., Rapoport, A., Hawari, I.M., Lensky, I.M., Berlin, D., Zivotofsky, D., Klement, E., Steinman, A., 2014. Novel description of force of infection and risk factors associated with *Theileria equi* in horses in Israel and in The Palestinian Authority. *Ticks Tick Borne Dis* 5, 366-372.
- Ahmed, J.S., 2002. The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of piroplasmoses. *Parasitol Res* 88, S48-50.
- Alanazi, A.D., Alyousif, M.S., Hassieb, M.M., 2012. Seroprevalence study on *Theileria equi* and *Babesia caballi* antibodies in horses from central province of Saudi Arabia. *J Parasitol* 98, 1015-1017.
- Alanazi, A.D., Said, A.E., Morin-Adeline, V., Alyousif, M.S., Slapeta, J., 2014. Quantitative PCR detection of *Theileria equi* using laboratory workflows to detect asymptomatic persistently infected horses. *Vet Parasitol* 206, 138-145.
- Alhassan, A., Govind, Y., Tam, N.T., Thekiso, O.M., Yokoyama, N., Inoue, N., Igarashi, I., 2007. Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and in vitro culture methods for the diagnosis of equine piroplasmosis. *Parasitol Res* 100, 1165-1168.
- Ali, S., Sugimoto, C., Onuma, M., 1996. Equine Piroplasmosis, Vol 7, 67-77.
- Allen, P.C., Frerichs, W.M., Holbrook, A.A., 1975a. Experimental acute *Babesia caballi* infections. I. Red blood cell dynamics. *Exp Parasitol* 37, 67-77.
- Allen, P.C., Frerichs, W.M., Holbrook, A.A., 1975b. Experimental acute *Babesia caballi* infections. II. Response of platelets and fibrinogen. *Exp Parasitol* 37, 373-379.
- Allsopp, M.T., Allsopp, B.A., 2006. Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. *Ann N Y Acad Sci* 1081, 509-517.
- Allsopp, M.T., Lewis, B.D., Penzhorn, B.L., 2007. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. *Vet Parasitol* 148, 130-136.
- Almarza Herranz, N., 1933. Sobre la diferenciación de *Piroplasma caballi* y *Nuttalia equi*. *Ganadería* 11, 24-37.
- Ambawat, H.K., Malhotra, D.V., Kumar, S., Dhar, S., 1999. Erythrocyte associated haemato-biochemical changes in *Babesia equi* infection experimentally produced in donkeys. *Vet Parasitol* 85, 319-324.
- ANCCE, 2020. Caballo de Pura Raza Española. <https://www.ancce.es/contenido/el-caballo-espanol>
- APHIS, 2020. Diagnostic Testing at the National Veterinary Services Laboratories (NVSL). https://www.aphis.usda.gov/animal_health/lab_info_services/downloads/AmesDiagnosticTestingCatalog.pdf
- Aziz, K.J., Al-Barwary, L.T., 2019. Epidemiological study of equine piroplasmosis (*Theileria equi* and *Babesia caballi*) by microscopic examination and competitive-ELISA in Erbil province North-Iraq. *Iran J Parasitol* 14, 404-412.
- Bahrami, S., Ghadrddan Mashhadi, A.R., Borujeni, M., Salarpur, M., 2014. Epidemiology of *Theileria equi* in Persian Arab horses from Iran. *Veterinárni medicína* 59, 2014-2409.
- Barbosa, A.D., Austen, J., Portas, T.J., Friend, J.A., Ahlstrom, L.A., Oskam, C.L., Ryan, U.M., Irwin, P.J., 2019. Sequence analyses at mitochondrial and nuclear loci reveal a novel *Theileria* sp. and aid in the phylogenetic resolution of piroplasms from Australian marsupials and ticks. *Plos One* 14, e0225822.
- Bartolome Del Pino, L.E., Nardini, R., Veneziano, V., Iacoponi, F., Cersini, A., Autorino, G.L., Buono, F., Scicluna, M., 2016. *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in central-southern Italy: sero-molecular survey and associated risk factors. *Ticks Tick Borne Dis* 7, 462-469.

- Battsetseg, B., Lucero, S., Xuan, X., Claveria, F.G., Inoue, N., Alhassan, A., Kanno, T., Igarashi, I., Nagasawa, H., Mikami, T., Fujisaki, K., 2002. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. *Vet Parasitol* 107, 351-357.
- Beck, R., Vojta, L., Mrljak, V., Marinculic, A., Beck, A., Zivicnjak, T., Caccio, S.M., 2009. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *Int J Parasitol* 39, 843-848.
- Belloli, C., Crescenzo, G., Lai, O., Carofiglio, V., Marang, O., Ormas, P., 2002. Pharmacokinetics of imidocarb dipropionate in horses after intramuscular administration. *Equine Vet J* 34, 625-629.
- Bernasconi, N.L., Traggiai, E., Lanzavecchia, A., 2002. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298, 2199-2202.
- Bhoora, R., Buss, P., Guthrie, A.J., Penzhorn, B.L., Collins, N.E., 2010a. Genetic diversity of piroplasms in plains zebra (*Equus quagga burchellii*) and Cape mountain zebra (*Equus zebra zebra*) in South Africa. *Vet Parasitol* 174, 145-149.
- Bhoora, R., Franssen, L., Oosthuizen, M.C., Guthrie, A.J., Zweggarth, E., Penzhorn, B.L., Jongejan, F., Collins, N.E., 2009. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. *Vet Parasitol* 159, 112-120.
- Bhoora, R., Quan, M., Franssen, L., Butler, C.M., Van der Kolk, J.H., Guthrie, A.J., Zweggarth, E., Jongejan, F., Collins, N.E., 2010b. Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses from South Africa. *Vet Parasitol* 168, 201-211.
- Bhoora, R., Quan, M., Matijala, P.T., Zweggarth, E., Guthrie, A.J., Collins, N.E., 2010c. Sequence heterogeneity in the equi merozoite antigen gene (EMA-1) of *Theileria equi* and development of an EMA-1-specific TaqMan MGB(TM) assay for the detection of *T. equi*. *Vet Parasitol* 172, 33-45.
- Bhoora, R., Quan, M., Zweggarth, E., Guthrie, A.J., Prinsloo, S.A., Collins, N.E., 2010d. Sequence heterogeneity in the gene encoding the rhoptry-associated protein-1 (RAP-1) of *Babesia caballi* isolates from South Africa. *Vet Parasitol* 169, 279-288.
- Bhoora, R.V., Pienaar, R., Cornelius, F., Josemans, A., Matthee, O., Marumo, R., Troskie, C., Mans, B.J., 2018. Multiplex hydrolysis-probe assay for the simultaneous detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in equids. *Vet Parasitol* 255, 61-68.
- Bork, S., Yokoyama, N., Matsuo, T., Claveria, F.G., Fujisaki, K., Igarashi, I., 2003. Clotrimazole, ketoconazole, and clodinafop-propargyl as potent growth inhibitors of equine *Babesia* parasites during in vitro culture. *J Parasitol* 89, 604-606.
- Bose, R., Jorgensen, W.K., Dalgliesh, R.J., Friedhoff, K.T., de Vos, A.J., 1995. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet Parasitol* 57, 61-74.
- Bowhill, T., 1905. Equine piroplasmosis, or "biliary fever". *The Journal of Hygiene* 5, 7-17.
- Braga, M., Costa, F.N., Gomes, D.R.M., Xavier, D.R., Andre, M.R., Goncalves, L.R., Freschi, C.R., Machado, R.Z., 2017. Genetic diversity of piroplasmids species in equids from island of Sao Luis, northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 26, 331-339.
- Bruning, A., 1996. Equine piroplasmosis an update on diagnosis, treatment and prevention. *Br Vet J* 152, 139-151.
- Bruning, A., Phipps, P., Posnett, E., Canning, E.U., 1997. Monoclonal antibodies against *Babesia caballi* and *Babesia equi* and their application in serodiagnosis. *Vet Parasitol* 68, 11-26.
- Butler, C.M., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M., Stout, T.A., van der Kolk, J.H., Wollenberg, L., Nielen, M., Jongejan, F., Werners, A.H., 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. *Vet J* 193, 381-385.
- Caccio, S., Camma, C., Onuma, M., Severini, C., 2000. The beta-tubulin gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is an informative marker for species discrimination. *Int J Parasitol* 30, 1181-1185.
- Camacho, A.T., Guitian, F.J., Pallas, E., Gestal, J.J., Olmeda, A.S., Habela, M.A., Telford III, S.R., Spielman, A., 2005. *Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain. *Trop Anim Health Pro* 37, 293-302.
- Camino, E., Carvajal, K., Lozano, F., Viñolo, C., Alende, T., Domínguez, L., Cruz-Lopez, F., 2016. Estudio de seroprevalencia de piroplasmosis equina en España en muestras previas a la exportación. Asociación de Especialistas en Diagnóstico Laboratorial Veterinario (AVEDILA).

- Campos, J.B.V., Andre, M.R., Goncalves, L.R., Freschi, C.R., Santos, F.M., de Oliveira, C.E., Piranda, E.M., de Andrade, G.B., Macedo, G.C., Machado, R.Z., Herrera, H.M., 2019. Assessment of equine piroplasmids in the Nhecolandia sub-region of Brazilian Pantanal wetland using serological, parasitological, molecular, and hematological approaches. *Ticks Tick Borne Dis* 10, 714-721.
- Cantu-Martinez, M.A., Segura-Correa, J.C., Silva-Paez, M.L., Avalos-Ramirez, R., Wagner, G.G., 2012. Prevalence of antibodies to *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from northeastern Mexico. *J Parasitol* 98, 869-870.
- Carbrey, E.A., Avery, R.J., Knowles, R.C., Sash, S.C., 1971. Chemotherapy of equine babesiosis. *J Am Vet Med Assoc* 159, 1538-1545.
- Chaligiannis, I., Fernandez de Mera, I.G., Papa, A., Sotiraki, S., de la Fuente, J., 2018. Molecular identification of tick-borne pathogens in ticks collected from dogs and small ruminants from Greece. *Exp Appl Acarol* 74, 443-453.
- Coleto, L., Etienne, M.O., 1999. Equine babesiosis : a disease linked to the extensive horse raising in the pasture land of Extremadura (" dehesa "). *Cahiers Options Méditerranéennes* 39, 273-276.
- Cordero del Campillo, M., Ordaz-Alvarez, M., Rojo-Vazquez, F.A., Escudero-Diez, A., 1974. On equine babesiosis in Spain. *Revista Iberica de Parasitologia* 34, 305-315.
- Coultous, R.M., McDonald, M., Rafferty, A.G., Shiels, B.R., Sutton, D.G.M., Weir, W., 2019a. Analysis of *Theileria equi* diversity in The Gambia using a novel genotyping method. *Transbound Emerg Dis* 67, 1213-1221.
- Coultous, R.M., Phipps, P., Dalley, C., Lewis, J., Hammond, T.A., Shiels, B.R., Weir, W., Sutton, D.G.M., 2019b. Equine piroplasmosis status in the UK: an assessment of laboratory diagnostic submissions and techniques. *Vet Rec* 184, 95.
- Criado-Fornelio, A., Gonzalez-del-Rio, M.A., Buling-Sarana, A., Barba-Carretero, J.C., 2004. The "expanding universe" of piroplasms. *Vet Parasitol* 119, 337-345.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Sarana, A., Barba-Carretero, J.C., 2003a. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. *Vet Parasitol* 113, 189-201.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Sarana, A., Barba-Carretero, J.C., 2003b. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Vet Parasitol* 114, 173-194.
- Criado, A., Martinez, J., Buling, A., Barba, J.C., Merino, S., Jefferies, R., Irwin, P.J., 2006. New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. *Vet Parasitol* 142, 238-247.
- Cruz, F., Fores, P., Ireland, J., Moreno, M.A., Newton, R., 2015. Freedom from equine infectious anaemia virus infection in Spanish Purebred horses. *Vet Rec Open* 2, e000074.
- Cruz, F., Fores, P., Mughini-Gras, L., Ireland, J., Moreno, M.A., Newton, J.R., 2016a. Seroprevalence and factors associated with equine herpesvirus type 1 and 4 in Spanish Purebred horses in Spain. *Vet Rec* 178, 398.
- Cruz, F., Fores, P., Mughini-Gras, L., Ireland, J., Moreno, M.A., Newton, R., 2016b. Seroprevalence and factors associated with seropositivity to equine arteritis virus in Spanish Purebred horses in Spain. *Equine Vet J* 48, 573-577.
- Cunha, C.W., McGuire, T.C., Kappmeyer, L.S., Hines, S.A., Lopez, A.M., Dellagostin, O.A., Knowles, D.P., 2006. Development of specific immunoglobulin G_a (IgG_a) and IgG_b antibodies correlates with control of parasitemia in *Babesia equi* infection. *Clin Vaccine Immunol* 13, 297-300.
- Dahiya, R., Salar, R.K., Mandal, K.D., Kumar, R., Tripathi, B.N., Pal, Y., Kumar, S., 2018. Risk factor analysis associated with *Theileria equi* infected equines in semi-arid and sub-humid ecological enzootic zones of India. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 12, 17-21.
- Davitkov, D., Vucicevic, M., Stevanovic, J., Krstic, V., Slijepcevic, D., Glavinic, U., Stanimirovic, Z., 2016. Molecular detection and prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses of central Balkan. *Acta Parasitol* 61, 337-342.
- De Blas, I., 2006. WinEpi (Working in Epidemiology). Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. <http://www.winepi.net/sp/index.htm>
- De Waal, D.T., 1990. The transovarial transmission of *Babesia caballi* by *Hyalomma truncatum*. *Onderstepoort J Vet Res* 57, 99-100.
- De Waal, D.T., 1992. Equine piroplasmosis - a review. *Brit Vet J* 148, 6-14.
- de Waal, D.T., van Heerden, J., Potgieter, F.T., 1987. An investigation into the clinical pathological changes and serological response in horses experimentally infected with *Babesia equi* and *Babesia caballi*. *Onderstepoort J Vet Res* 54, 561-568.

- De Waal, D.T., van Heerden, J., 2004. Equine piroplasmosis, In: Infectious Diseases of Livestock. Oxford University Press, pp. 425-433.
- Deloitte, 2013. Estudio del impacto del sector ecuestre en España. Real Federación Hípica Española.
http://www.federacio-catalana-hipica.cat/phocadownload/ESTUDIO_DEL_IMPACTO_%20ECUESTRE_ESPANA.pdf
- Díaz-Sánchez, A.A., Pires, M.S., Estrada, C.Y., Canizares, E.V., Del Castillo Domínguez, S.L., Cabezas-Cruz, A., Rivero, E.L., da Fonseca, A.H., Massard, C.L., Corona-González, B., 2018. First molecular evidence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Cuba. *Parasitol Res* 117, 3109-3118.
- Dohoo, I., Martin, W., Stryhn, H., 2003a. Confounder bias: analytic control and matching In: Veterinary Epidemiologic Research. Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Charlottetown, Prince Edward Island, Canada, pp. 235-270.
- Dohoo, I., Martin, W., Stryhn, H., 2003b. Sampling In: Veterinary Epidemiologic Research. Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Charlottetown, Prince Edward Island, Canada, pp. 27-47.
- Donnellan, C.M., Marais, H. J., 2009. Equine Piroplasmosis, In: Infectious Disease of Horses. EVJ Ltd, UK, pp. 333-340.
- Donnelly, J., Phipps, L.P., Watkins, K.L., 1982. Evidence of maternal antibodies to *Babesia equi* and *B. caballi* in foals of seropositive mares. *Equine Vet J* 14, 126-128.
- Dos Santos, T.M., Roier, E.C., Santos, H.A., Pires, M.S., Vilela, J.A., Moraes, L.M., Almeida, F.Q., Baldani, C.D., Machado, R.Z., Massard, C.L., 2011. Factors associated to *Theileria equi* in equids of two microregions from Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 20, 235-241.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32, 1792-1797.
- Elata, A., Mossaad, E., Satti, R., Matar, N., Ohari, Y., Xuan, X., Inoue, N., Suganuma, K., 2020. Serological and molecular detection of selected hemoprotozoan parasites in donkeys in West Omdurman, Khartoum State, Sudan. *J Vet Med Sci* 82, 286-293.
- Ellis, P., 2000. Equine piroplasmosis visits Australia in 2000. *Aust Vet J* 78, 380.
- Erbsloh, J.K., 1975. Babesiosis in the newborn foal. *J Reprod Fertil Suppl*, 725-726.
- Escalante, A.A., Freeland, D.E., Collins, W.E., Lal, A.A., 1998. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8124-8129.
- Farkas, R., Tanczos, B., Gyurkovszky, M., Foldvari, G., Solymosi, N., Edelhofer, R., Hornok, S., 2013. Serological and molecular detection of *Theileria equi* infection in horses in Hungary. *Vet Parasitol* 192, 143-148.
- Francoso, R., Riccio, A.V., Fernandes, C.B., Alonso, M.A., Belli, C.B., 2018. Transplacental transmission of *Theileria equi* in mules: Should we worry? *Vet Parasitol* 264, 39-41.
- Frerichs, W.M., Allen, P.C., Holbrook, A.A., 1973. Equine piroplasmosis (*Babesia equi*): therapeutic trials of imidocarb dihydrochloride in horses and donkeys. *Vet Rec* 93, 73-75.
- Friedhoff, K.T., Soule, C., 1996. An account on equine babesioses. *Rev Sci Tech* 15, 1191-1201.
- Friedhoff, K.T., Tenter, A.M., Muller, I., 1990. Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. *Rev Sci Tech* 9, 1187-1194.
- García-Bocanegra, I., Arenas-Montes, A., Hernandez, E., Adaszek, L., Carbonero, A., Almería, S., Jaen-Tellez, J.A., Gutierrez-Palomino, P., Arenas, A., 2013. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. *Vet J* 195, 172-178.
- George, J.E., Davey, R.B., Pound, J.M., 2002. Introduced ticks and tick-borne diseases: the threat and approaches to eradication. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 18, 401-416.
- Georges, K.C., Ezeokoli, C.D., Sparagano, O., Pargass, I., Campbell, M., D'Abadie, R., Yabsley, M.J., 2011. A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. *Vet Parasitol* 175, 363-366.
- Gimenez, F., Hines, S.A., Evanoff, R., Ojo, K.K., Van Voorhis, W.C., Maly, D.J., Vidadala, R.S.R., Mealey, R.H., 2018. In vitro growth inhibition of *Theileria equi* by bumped kinase inhibitors. *Vet Parasitol* 251, 90-94.
- Gizachew, A., Schuster, R.K., Joseph, S., Wernery, R., Georgy, N., Elizabeth, S., Asfaw, Y., Gari, F., Wernery, U., 2013. Piroplasmosis in donkeys — a hematological and serological study in central Ethiopia. *J Equine Vet Sci* 33, 18-21.

- Golynski, A.A., Fernandes, K.R., Baldani, C.D., Golynski, A.L., Madeiro, A.S., Machado, R.Z., Botteon Pde, T., Massard, C.L., 2008. Seroepidemiological studies on *Babesia equi* in horses from the State of Rio Grande do Sul determined by indirect immunofluorescence test and ELISA. *Rev Bras Parasitol Vet* 17 Suppl 1, 317-321.
- Grandi, G., Molinari, G., Tittarelli, M., Sasser, D., Kramer, L.H., 2011. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses from northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 955-956.
- Graese, J.F., Ueti, M.W., Nelson, J.T., Knowles, D.P., Kappmeyer, L.S., Bunn, T.O., 2013. Efficacy of imidocarb dipropionate in eliminating *Theileria equi* from experimentally infected horses. *Vet J* 196, 541-546.
- Guidi, E., Pradier, S., Lebert, I., Leblond, A., 2015. Piroplasmosis in an endemic area: analysis of the risk factors and their implications in the control of Theileriosis and Babesiosis in horses. *Parasitol Res* 114, 71-83.
- Güven, E., Avcioglu, H., Deniz, A., Balkaya, I., Abay, U., Yavuz, S., Akyuz, M., 2017. Prevalence and molecular characterization of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in jereed horses in Erzurum, Turkey. *Acta Parasitol* 62, 207-213.
- Habela, M., Gragera-Slikker, A., Moreno, A., Montes, G., Sevilla, R., 2005. Piroplasmosis equina: conocimiento y grado de concienciación de los productores de caballos Pura Raza Española. *Equinus* 11, 17-34.
- Habela, M., Reina, D., Nieto, C., Verdugo, S. G. y Navarrete, I., 1989. Epidemiología de la babesiosis equina en Extremadura: estudio preliminar. *Medicina Veterinaria* 6, 31-39.
- Hailat, N.Q., Lafi, S.Q., al-Darraj, A.M., al-Ani, F.K., 1997. Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. *Vet Parasitol* 69, 1-8.
- Hall, C.M., Busch, J.D., Scoles, G.A., Palma-Cagle, K.A., Ueti, M.W., Kappmeyer, L.S., Wagner, D.M., 2013. Genetic characterization of *Theileria equi* infecting horses in North America: evidence for a limited source of U.S. introductions. *Parasites & vectors* 6, 35-35.
- Hanafusa, Y., Cho, K.O., Kanemaru, T., Wada, R., Sugimoto, C., Onuma, M., 1998. Pathogenesis of *Babesia caballi* infection in experimental horses. *J Vet Med Sci* 60, 1127-1132.
- Harland, M.M., Stewart, A.J., Bose, R., 2011. Purchase examinations and importation requirements for European performance horses and their semen entering the United States. *Compend Contin Educ Vet* 33, E3.
- Heuchert, C.M., de Giulli, V., Jr., de Athaide, D.F., Bose, R., Friedhoff, K.T., 1999. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. *Vet Parasitol* 85, 1-11.
- Hines, S.A., Ramsay, J.D., Kappmeyer, L.S., Lau, A.O., Ojo, K.K., Van Voorhis, W.C., Knowles, D.P., Mealey, R.H., 2015. *Theileria equi* isolates vary in susceptibility to imidocarb dipropionate but demonstrate uniform in vitro susceptibility to a bumped kinase inhibitor. *Parasit Vectors* 8, 33.
- Holbrook, A.A., 1969. Biology of equine piroplasmosis. *J Am Vet Med Assoc* 155, 453-454.
- Holbrook, A.A., Anthony, D.W., Johnson, A.J., 1968. Observations on the development of *Babesia caballi* (Nuttall) in the tropical horse tick *Dermacentor nitens* Neumann. *J Protozool* 15, 391-396.
- Holman, P.J., Chievers, L., Frerichs, W.M., Olson, D., Wagner, G.G., 1994. *Babesia equi* erythrocytic stage continuously cultured in an enriched medium. *J Parasitol* 80, 232-236.
- Holman, P.J., Frerichs, W.M., Chievers, L., Wagner, G.G., 1993. Culture confirmation of the carrier status of *Babesia caballi*-infected horses. *J Clin Microbiol* 31, 698-701.
- Holman, P.J., Hietala, S.K., Kayashima, L.R., Olson, D., Waghela, S.D., Wagner, G.G., 1997. Case report: field-acquired subclinical *Babesia equi* infection confirmed by in vitro culture. *J Clin Microbiol* 35, 474-476.
- Huang, X., Xuan, X., Xu, L., Zhang, S., Yokoyama, N., Suzuki, N., Igarashi, I., 2004. Development of an immunochromatographic test with recombinant EMA-2 for the rapid detection of antibodies against *Babesia equi* in horses. *J Clin Microbiol* 42, 359-361.
- Huang, X., Xuan, X., Yokoyama, N., Xu, L., Suzuki, H., Sugimoto, C., Nagasawa, H., Fujisaki, K., 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. *J Clin Microbiol* 41, 1147-1151.
- Hughes, V.L., Randolph, S.E., 2001a. Testosterone depresses innate and acquired resistance to ticks in natural rodent hosts: a force for aggregated distributions of parasites. *J Parasitol* 87, 49-54.
- Hughes, V.L., Randolph, S.E., 2001b. Testosterone increases the transmission potential of tick-borne parasites. *Parasitology* 123, 365-371.
- Hunfeld, K.P., Hildebrandt, A., Gray, J.S., 2008. Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *Int J Parasitol* 38, 1219-1237.

- Ikadai, H., Xuan, X., Igarashi, I., Tanaka, S., Kanemaru, T., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Suzuki, N., Mikami, T., 1999. Cloning and expression of a 48-kilodalton *Babesia caballi* merozoite rhoptry protein and potential use of the recombinant antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 37, 3475-3480.
- Ionita, M., Nicorescu, I.M., Pfister, K., Mitrea, I.L., 2018. Parasitological and molecular diagnostic of a clinical *Babesia caballi* outbreak in southern Romania. *Parasitol Res* 117, 2333-2339.
- Jaffer, O., Abdishakur, F., Hakimuddin, F., Riya, A., Wernery, U., Schuster, R.K., 2010. A comparative study of serological tests and PCR for the diagnosis of equine piroplasmosis. *Parasitol Res* 106, 709-713.
- Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., Malandrin, L., 2018. The complexity of piroplasms life cycles. *Front Cell Infect Microbiol* 8, 248.
- Jasem, H., Ghazi, Y., Azzal, G., Othman, R., 2015. Conventional and molecular detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* parasites in infected camels in south of Iraq. *Bas.J.Vet.Res.* 14, 110-121.
- Kamyngkird, K., Yangtara, S., Desquesnes, M., Cao, S., Jittapalapong, S., Nimsuphan, B., Terkawi, A., Masatani, T., Nishikawa, Y., Igarashi, I., 2014. Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses and mules from northern Thailand. *Journal of Protozoology Research*, 11-17.
- Kappmeyer, L.S., Perryman, L.E., Hines, S.A., Baszler, T.V., Katz, J.B., Hennager, S.G., Knowles, D.P., 1999. Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* by recombinant *B. caballi* rhoptry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 37, 2285-2290.
- Karatepe, B., Karatepe, M., Cakmak, A., Karaer, Z., Ergun, G., 2009. Investigation of seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Nigde province, Turkey. *Trop Anim Health Prod* 41, 109-113.
- Katz, J., Dewald, R., Nicholson, J., 2000. Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia equi*, *Babesia caballi*, *Trypanosoma equiperdum*, and *Burkholderia mallei* infection in horses. *J Vet Diagn Invest* 12, 46-50.
- Kerber, C.E., Labruna, M.B., Ferreira, F., De Waal, D.T., Knowles, D.P., Gennari, S.M., 2009. Prevalence of equine piroplasmosis and its association with tick infestation in the State of Sao Paulo, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 18, 1-8.
- Ketter-Ratzon, D., Tirosh-Levy, S., Nachum-Biala, Y., Saar, T., Qura'n, L., Zivotofsky, D., Abdeen, Z., Baneth, G., Steinman, A., 2017. Characterization of *Theileria equi* genotypes in horses in Israel, the Palestinian Authority and Jordan. *Ticks Tick Borne Dis* 8, 499-505.
- Khajuria, V., Godara, R., Yadav, A., Katoch, R., 2015. Prevalence of ixodid ticks in dairy animals of Jammu region. *J Parasit Dis* 39, 418-421.
- Kim, C.M., Blanco, L.B., Alhassan, A., Iseki, H., Yokoyama, N., Xuan, X., Igarashi, I., 2008. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. *Vet Parasitol* 151, 158-163.
- Klein, S.L., 2004. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol* 26, 247-264.
- Knowles, D.P., Jr., Kappmeyer, L.S., Perryman, L.E., 1994. Specific immune responses are required to control parasitemia in *Babesia equi* infection. *Infect Immun* 62, 1909-1913.
- Knowles, D.P., Jr., Kappmeyer, L.S., Stiller, D., Hennager, S.G., Perryman, L.E., 1992. Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi*. *J Clin Microbiol* 30, 3122-3126.
- Knowles, D.P., Jr., Perryman, L.E., Goff, W.L., Miller, C.D., Harrington, R.D., Gorham, J.R., 1991. A monoclonal antibody defines a geographically conserved surface protein epitope of *Babesia equi* merozoites. *Infect Immun* 59, 2412-2417.
- Knowles, D.P., Kappmeyer, L.S., Haney, D., Herndon, D.R., Fry, L.M., Munro, J.B., Sears, K., Ueti, M.W., Wise, L.N., Silva, M., Schneider, D.A., Grause, J., White, S.N., Tretina, K., Bishop, R.P., Odongo, D.O., Pelzel-McCluskey, A.M., Scoles, G.A., Mealey, R.H., Silva, J.C., 2018. Discovery of a novel species, *Theileria haneyi* n. sp., infective to equids, highlights exceptional genomic diversity within the genus *Theileria*: implications for apicomplexan parasite surveillance. *Int J Parasitol* 48, 679-690.
- Knowles, R.C., 1988. Equine babesiosis: Epidemiology, control and chemotherapy. *J Equine Vet Sci* 8, 61-64.
- Knowles, R.C., Mathis, R.M., Bryant, J.E., Willers, K.H., 1966. Equine piroplasmosis. *J Am Vet Med Assoc* 148, 407-410.

- Kouam, M.K., Kantzoura, V., Gajadhar, A.A., Theis, J.H., Papadopoulos, E., Theodoropoulos, G., 2010. Seroprevalence of equine piroplasms and host-related factors associated with infection in Greece. *Vet Parasitol* 169, 273-278.
- Kumar, S., Gupta, A.K., Pal, Y., Dwivedi, S.K., 2003. In-vivo therapeutic efficacy trial with artemisinin derivative, buparvaquone and imidocarb dipropionate against *Babesia equi* infection in donkeys. *J Vet Med Sci* 65, 1171-1177.
- Kumar, S., Malhotra, D.V., Dhar, S., Nichani, A.K., 2002. Vaccination of donkeys against *Babesia equi* using killed merozoite immunogen. *Vet Parasitol* 106, 19-33.
- Kumar, S., Rakha, N.K., Goyal, L., Goel, P., Kumar, R., Kumar, A., Kumar, S., 2015. Diagnostic application of recombinant equine merozoite surface antigen-1 in ELISA for detection of *Theileria equi* specific antibodies. *Jpn J Vet Res* 63, 129-137.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33, 1870-1874.
- Kumar, S., Sudan, V., Shanker, D., Devi, A., 2020. *Babesia (Theileria) equi* genotype A among Indian equine population. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 19, 100367.
- Kuttler, K.L., Gipson, C.A., Goff, W.L., Johnson, L.W., 1986. Experimental *Babesia equi* infection in mature horses. *Am J Vet Res* 47, 1668-1670.
- Kuttler, K.L., Goff, W.L., Gipson, C.A., Blackburn, B.O., 1988. Serologic response of *Babesia equi*-infected horses as measured by complement-fixation and indirect fluorescent antibody tests. *Vet Parasitol* 26, 199-205.
- Larsson, A., 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* 30, 3276-3278.
- Laus, F., Spaterna, A., Faillace, V., Veronesi, F., Ravagnan, S., Beribe, F., Cerquetella, M., Meligrana, M., Tesei, B., 2015. Clinical investigation on *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Italian donkeys. *BMC Vet Res* 11, 100.
- Laveran, M., 1901. Contribution a l'étude de *Piroplasma equi*. *CR Soc. Biol* 53, 385-388.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loebllich, A.R., 3rd, Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., Wallace, F.G., 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* 27, 37-58.
- Lewis, B.D., Penzhorn, B.L., Volkmann, D.H., 1999. Could treatment of pregnant mares prevent abortions due to equine piroplasmosis? *J S Afr Vet Assoc* 70, 90-91.
- Lewis, M.J., Wagner, B., Woof, J.M., 2008. The different effector function capabilities of the seven equine IgG subclasses have implications for vaccine strategies. *Mol Immunol* 45, 818-827.
- Liu, Q., Meli, M.L., Zhang, Y., Meili, T., Stirn, M., Riond, B., Weibel, B., Hofmann-Lehmann, R., 2016. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene in *Theileria equi* from horses presented in Switzerland. *Vet Parasitol* 221, 24-29.
- Lobanov, V.A., Peckle, M., Massard, C.L., Brad Scandrett, W., Gajadhar, A.A., 2018. Development and validation of a duplex real-time PCR assay for the diagnosis of equine piroplasmosis. *Parasit Vectors* 11, 125.
- Lopez-Abad Ballesteros, G., 1947. Dos casos de piroplasmosis equina en la provincia de Toledo. *Ciencia Vet* 8, 254-259.
- Machado, R.Z., Toledo, C.Z., Teixeira, M.C., Andre, M.R., Freschi, C.R., Sampaio, P.H., 2012. Molecular and serological detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in donkeys (*Equus asinus*) in Brazil. *Vet Parasitol* 186, 461-465.
- MAGRAMA, 2012. Programa ARCA (Sistema Nacional de Información de Razas). <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/default.aspx>
- Mahdy, O., Nassar, A., Mohamed, B., 2016. Comparative diagnosis utilizing molecular and serological techniques of *Theileria equi* infection in distinct equine populations in Egypt. *International Journal of ChemTech Research* 9, 185-197.
- Mahmoud, M.S., El-Ezz, N.T., Abdel-Shafy, S., Nassar, S.A., El Namaky, A.H., Khalil, W.K., Knowles, D., Kappmeyer, L., Silva, M.G., Suarez, C.E., 2016. Assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in equine populations in Egypt by molecular, serological and hematological approaches. *Parasit Vectors* 9, 260.
- Mahoney, D.F., Wright, I.G., Frerichs, W.M., Groenendyk, S., O'Sullivan, B.M., Roberts, M.C., Waddell, A.H., 1977. The identification of *Babesia equi* in Australia. *Aust Vet J* 53, 461-464.
- Malekifard, F., Tavassoli, M., Yakhchali, M., Darvishzadeh, R., 2014. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* using microscopic and molecular methods in horses in suburb of Urmia, Iran. *Vet Res Forum* 5, 129-133.
- Manna, G., Cersini, A., Nardini, R., Bartolome Del Pino, L.E., Antognetti, V., Zini, M., Conti, R., Lorenzetti, R., Veneziano, V., Autorino, G.L., Scicluna, M.T., 2018. Genetic diversity of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infecting horses of central-southern Italy and preliminary results of its correlation with clinical and serological status. *Ticks Tick Borne Dis* 9, 1212-1220.

- Mans, B.J., Pienaar, R., Latif, A.A., Potgieter, F.T., 2011. Diversity in the 18S SSU rRNA V4 hyper-variable region of *Theileria* spp. in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) and cattle from southern Africa. *Parasitology* 138, 766-779.
- MAPA, 2020a. Documentos Públicos Comercio Exterior Ganadero (CEXGAN). <https://servicio.magrama.gob.es/cexgan/publico/publico/Buscador.aspx>
- MAPA, 2020b. Programa ARCA (Sistema Nacional de Información de Razas). <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/default.aspx>
- Maurer, F.D., 1962. Equine piroplasmiasis-another emerging disease. *J Am Vet Med Assoc* 141, 699-702.
- McGuire, T.C., Van Hoosier, G.L., Jr., Henson, J.B., 1971. The complement-fixation reaction in equine infectious anemia: demonstration of inhibition by IgG (T). *J Immunol* 107, 1738-1744.
- Mehlhorn, H., Schein, E., 1998. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. *Parasitol Res* 84, 467-475.
- Meyer, C., Guthrie, A.J., Stevens, K.B., 2005. Clinical and clinicopathological changes in 6 healthy ponies following intramuscular administration of multiple doses of imidocarb dipropionate. *J S Afr Vet Assoc* 76, 26-32.
- Mierzejewska, E.J., Welc-Faleciak, R., Bednarska, M., Rodo, A., Bajer, A., 2014. The first evidence for vertical transmission of *Babesia canis* in a litter of Central Asian Shepherd dogs. *Ann Agric Environ Med* 21, 500-503.
- Montes-Cortes, M.G., Fernandez-Garcia, J.L., Martinez-Estellez, M.A.H., 2017. Genetic variation of the beta-tubulin gene of *Babesia caballi* strains. *J Arthropod Borne Dis* 11, 344-353.
- Montes Cortes, M.G., Fernandez-Garcia, J.L., Habela Martinez-Estellez, M.A., 2017. Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Spain. *Parasite* 24, 14.
- Montes Cortes, M.G., Fernandez-Garcia, J.L., Habela Martinez-Estellez, M.A., 2019. A multinested PCR for detection of the equine piroplasmids *Babesia caballi* and *Theileria equi*. *Ticks Tick Borne Dis* 10, 305-313.
- Moretti, A., Mangili, V., Salvatori, R., Maresca, C., Scoccia, E., Torina, A., Moretta, I., Gabrielli, S., Tampieri, M.P., Pietrobelli, M., 2010. Prevalence and diagnosis of *Babesia* and *Theileria* infections in horses in Italy: a preliminary study. *Vet J* 184, 346-350.
- Mostafavi, E., Esmailnejad, B., Meysam Abtahi Foroushani, S., 2020. Evaluation of cytokines and sialic acids contents in horses naturally infected with *Theileria equi*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 70, 101453.
- Motloang, M.Y., Thekisoe, O.M., Alhassan, A., Bakheit, M., Motheo, M.P., Masangane, F.E., Thibedi, M.L., Inoue, N., Igarashi, I., Sugimoto, C., Mbatia, P.A., 2008. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horses belonging to resource-poor farmers in the north-eastern Free State province, South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 75, 141-146.
- Mshelia, W.P., Sambo, K.W., Adamu, S., Edeh, E.R., Onoja, I.I., 2016. Persistence of equine piroplasmiasis in horses in Nigeria. *J Equine Vet Sci* 39, 104-105.
- Munkhjargal, T., Sivakumar, T., Battsetseg, B., Nyamjargal, T., Aboulaila, M., Purevtseren, B., Bayarsaikhan, D., Byambaa, B., Terkawi, M.A., Yokoyama, N., Igarashi, I., 2013. Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province, Mongolia. *Infect Genet Evol* 16, 178-185.
- Nagai, A., Yokoyama, N., Matsuo, T., Bork, S., Hirata, H., Xuan, X., Zhu, Y., Claveria, F.G., Fujisaki, K., Igarashi, I., 2003. Growth-inhibitory effects of artesunate, pyrimethamine, and pamaquine against *Babesia equi* and *Babesia caballi* in in vitro cultures. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 800-803.
- Nagore, D., Garcia-Sanmartin, J., Garcia-Perez, A.L., Juste, R.A., Hurtado, A., 2004. Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: epidemiological survey and phylogenetic analysis. *Vet Parasitol* 123, 41-54.
- NCBI, 2020. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nicolaiewsky, T.B., Richter, M.F., Lunge, V.R., Cunha, C.W., Delagostin, O., Ikuta, N., Fonseca, A.S., da Silva, S.S., Ozaki, L.S., 2001. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. *Vet Parasitol* 101, 9-21.
- Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N., Kanda, H., 2015. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol* 53, 1-5.

- Nugraha, A.B., Cahyaningsih, U., Amrozi, A., Ridwan, Y., Agungpriyono, S., Taher, D.M., Guswanto, A., Gantuya, S., Tayebwa, D.S., Tuvshintulga, B., Sivakumar, T., Yokoyama, N., Igarashi, I., 2018. Serological and molecular prevalence of equine piroplasmosis in Western Java, Indonesia. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 14, 1-6.
- Nuttall, G.H.F., and Strickland, C., 1910. Die parasiten der pferdepiroplasmose des bliary fever. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. B* 56, 524-525.
- Oduori, D.O., Onyango, S.C., Kimari, J.N., MacLeod, E.T., 2015. A field survey for the seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in donkeys from Nuus Division, Kenya. *Ticks Tick Borne Dis* 6, 683-688.
- OIE, 2018. Equine Piroplasmosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 3.5.8.
https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.05.08_Piroplasmosis_equina.pdf
- OIE, 2020. Animal Health Information.
https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home
- Oladosu, L.A., 1988. Effects of intravenous corticosteroid on the pathogenicity of *Babesia equi* infection of donkeys (*Equus asinus*). *Zentralbl Veterinarmed B* 35, 509-514.
- Oladosu, L.A., Olufemi, B.E., 1992. Haematology of experimental babesiosis and ehrlichiosis in steroid immunosuppressed horses. *Zentralbl Veterinarmed B* 39, 345-352.
- Onyiche, T.E., Suganuma, K., Igarashi, I., Yokoyama, N., Xuan, X., Thekisoe, O., 2019. A review on equine piroplasmosis: epidemiology, vector ecology, risk factors, host immunity, diagnosis and control. *International journal of environmental research and public health* 16, 1736.
- Osman, S.A., 2017. Clinical, haematological and therapeutic studies on babesiosis in Arabian horses in the Qassim region, central of Saudi Arabia. *Journal of Applied Animal Research* 45, 118-121.
- Oura, C.A., Bishop, R.P., Wampande, E.M., Lubega, G.W., Tait, A., 2004. Application of a reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda. *Int J Parasitol* 34, 603-613.
- Ozubek, S., Aktas, M., 2018. Genetic diversity and prevalence of piroplasm species in equids from Turkey. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 59, 47-51.
- Peckle, M., Pires, M.S., Dos Santos, T.M., Roier, E.C., da Silva, C.B., Vilela, J.A., Santos, H.A., Massard, C.L., 2013. Molecular epidemiology of *Theileria equi* in horses and their association with possible tick vectors in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol Res* 112, 2017-2025.
- Pfaffle, M., Littwin, N., Munders, S.V., Petney, T.N., 2013. The ecology of tick-borne diseases. *Int J Parasitol* 43, 1059-1077.
- Pfeifer Barbosa, I., Bose, R., Peymann, B., Friedhoff, K.T., 1995. Epidemiological aspects of equine babesioses in a herd of horses in Brazil. *Vet Parasitol* 58, 1-8.
- Phipps, L.P., Otter, A., 2004. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. *Vet Rec* 154, 406-408.
- Piantedosi, D., D'Alessio, N., Di Loria, A., Di Prisco, F., Mariani, U., Neola, B., Santoro, M., Montagnaro, S., Capelli, G., Veneziano, V., 2014. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in donkeys from southern Italy. *Vet J* 202, 578-582.
- Pitel, P.H., Pronost, S., Scriver, T., Leon, A., Richard, E., Fortier, G., 2010. Molecular detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in the bone marrow of asymptomatic horses. *Vet Parasitol* 170, 182-184.
- Posada-Guzman, M.F., Dolz, G., Romero-Zuniga, J.J., Jimenez-Rocha, A.E., 2015. Detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in blood from equines from four indigenous communities in Costa Rica. *Vet Med Int* 2015, 236278.
- Qablan, M.A., Obornik, M., Petzelkova, K.J., Sloboda, M., Shudiefat, M.F., Horin, P., Lukes, J., Modry, D., 2013. Infections by *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Jordanian equids: epidemiology and genetic diversity. *Parasitology* 140, 1096-1103.
- Qablan, M.A., Sloboda, M., Jirku, M., Obornik, M., Dwairi, S., Amr, Z.S., Horin, P., Lukes, J., Modry, D., 2012. Quest for the piroplasms in camels: identification of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Jordanian dromedaries by PCR. *Vet Parasitol* 186, 456-460.
- Rapoport, A., Aharonson-Raz, K., Berlin, D., Tal, S., Gottlieb, Y., Klement, E., Steinman, A., 2014. Molecular characterization of the *Babesia caballi* RAP-1 gene and epidemiological survey in horses in Israel. *Infect Genet Evol* 23, 115-120.
- Rashid, H.B., Chaudhry, M., Rashid, H., Pervez, K., Khan, M.A., Mahmood, A.K., 2008. Comparative efficacy of diminazene diaceturate and diminazene aceturate for the treatment of babesiosis in horses. *Trop Anim Health Prod* 40, 463-467.

- Ribeiro, A.J., Cardoso, L., Maia, J.M., Coutinho, T., Cotovio, M., 2013. Prevalence of *Theileria equi*, *Babesia caballi*, and *Anaplasma phagocytophilum* in horses from the north of Portugal. *Parasitol Res* 112, 2611-2617.
- Roberts, C.W., Walker, W., Alexander, J., 2001. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev* 14, 476-488.
- Roberts, E.D., Morehouse, L.G., Gainer, J.H., Mc, D.H., 1962. Equine piroplasmosis. *J Am Vet Med Assoc* 141, 1323-1329.
- Romiti, F., Magliano, A., Antognetti, V., Manna, G., Cersini, A., Scicluna, M.T., De Liberato, C., 2020. Investigation of ixodid ticks as vectors of *Babesia caballi* and *Theileria equi* (Protozoa: Apicomplexa) in central Italy. *J Vector Ecol* 45, 25-31.
- Ros-Garcia, A., M'Ghirbi, Y., Hurtado, A., Bouattour, A., 2013. Prevalence and genetic diversity of piroplasm species in horses and ticks from Tunisia. *Infect Genet Evol* 17, 33-37.
- Rosa, C.T., Pazzi, P., Nagel, S., McClure, V., Christie, J., Troskie, M., Dvir, E., 2014. Theileriosis in six dogs in South Africa and its potential clinical significance. *J S Afr Vet Assoc* 85, 1114.
- Rosales, R., Rangel-Rivas, A., Escalona, A., Jordan, L.S., Gonzatti, M.I., Aso, P.M., Perrone, T., Silva-Iturriza, A., Mijares, A., 2013. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Venezuelan horses using competitive-inhibition ELISA and PCR. *Vet Parasitol* 196, 37-43.
- Rothschild, C.M., 2013. Equine piroplasmosis. *J Equine Vet Sci* 33, 497-508.
- Rubel, F., Kotteck, M., 2010. Observed and projected climate shifts 1901-2100 depicted by world maps of the Koppen-Geiger climate classification. *Meteorol Z* 19, 135-141.
- Rudolph, W., Correa, J., Zurita, L., Manley, W., 1975. Equine piroplasmosis: leukocytic response to *Babesia equi* (Laveran, 1901) infection in Chile. *Br Vet J* 131, 601-609.
- Ruegg, S.R., Torgerson, P., Deplazes, P., Mathis, A., 2007. Age-dependent dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in southwest Mongolia based on IFAT and/or PCR prevalence data from domestic horses and ticks. *Parasitology* 134, 939-947.
- Ruiz-Fons, F., Fernandez-de-Mera, I.G., Acevedo, P., Hofle, U., Vicente, J., de la Fuente, J., Gortazar, C., 2006. Ixodid ticks parasitizing Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) and European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: geographical and temporal distribution. *Vet Parasitol* 140, 133-142.
- Sadava, E., Bozal, A., 1945. Un caso de ictericia con hemoglobinuria de probable origen parasitario. *Veterinaria (Madrid)* 9, 566-569.
- Sakha, M., 2007. Successful treatment of babesiosis in a horse. *Journal of Veterinary Research* 62, 155-157.
- Salim, B., Alanazi, A.D., Omori, R., Alyousif, M.S., Alanazi, I.O., Katakura, K., Nakao, R., 2019. Potential role of dogs as sentinels and reservoirs for piroplasms infecting equine and cattle in Riyadh City, Saudi Arabia. *Acta Trop* 193, 78-83.
- Salim, B., Bakheit, M.A., Kamau, J., Nakamura, I., Sugimoto, C., 2010. Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene within *Theileria equi* from horses in Sudan. *Parasitol Res* 106, 493-498.
- Salim, B.O., Hassan, S.M., Bakheit, M.A., Alhassan, A., Igarashi, I., Karanis, P., Abdelrahman, M.B., 2008. Diagnosis of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Sudan using ELISA and PCR. *Parasitol Res* 103, 1145-1150.
- Sant, C., d'Abadie, R., Pargass, I., Basu, A.K., Asgarali, Z., Charles, R.A., Georges, K.C., 2016. Prospective study investigating transplacental transmission of equine piroplasmosis in thoroughbred foals in Trinidad. *Vet Parasitol* 226, 132-137.
- Schein, E., Rehbein, G., Voigt, W.P., Zweggarth, E., 1981. *Babesia equi* (Laveran 1901) 1. Development in horses and in lymphocyte culture. *Tropenmed Parasitol* 32, 223-227.
- Schein, F.B., Maia, M.O., Witter, R., Marcili, A., Camargo, L.M., Dutra, V., Nakazato, L., Candido, S.L., Almeida, E.M., Oliveira, A.C.S., Pacheco, R.C., 2018. Molecular survey and genetic diversity of piroplasmids in equids from Midwestern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 27, 464-472.
- Schoeman, J.P., 2009. Canine babesiosis. *Onderstepoort J Vet Res* 76, 59-66.
- Schwarz, A., Maier, W.A., Kistemann, T., Kampen, H., 2009. Analysis of the distribution of the tick *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae) in a nature reserve of western Germany using Geographic Information Systems. *Int J Hyg Environ Health* 212, 87-96.
- Schwint, O.N., Ueti, M.W., Palmer, G.H., Kappmeyer, L.S., Hines, M.T., Cordes, R.T., Knowles, D.P., Scoles, G.A., 2009. Imidocarb dipropionate clears persistent *Babesia caballi* infection with elimination of transmission potential. *Antimicrob Agents Ch* 53, 4327-4332.

- Scoles, G.A., Hutcheson, H.J., Schlater, J.L., Hennager, S.G., Pelzel, A.M., Knowles, D.P., 2011. Equine piroplasmosis associated with *Amblyomma cajennense* ticks, Texas, USA. *Emerg Infect Dis* 17, 1903-1905.
- Scoles, G.A., Ueti, M.W., 2015. Vector ecology of equine piroplasmosis. *Annu Rev Entomol* 60, 561-580.
- Sears, K.P., Kappmeyer, L.S., Wise, L.N., Silva, M., Ueti, M.W., White, S., Reif, K.E., Knowles, D.P., 2019. Infection dynamics of *Theileria equi* and *Theileria haneyi*, a newly discovered apicomplexan of the horse. *Vet Parasitol* 271, 68-75.
- Sevinc, F., Maden, M., Kumars, C., Sevinc, M., Ekici, O.D., 2008. A comparative study on the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horse sub-populations in Turkey. *Vet Parasitol* 156, 173-177.
- Shkap, V., Cohen, I., Leibovitz, B., Savitsky, Pipano, E., Avni, G., Shofer, S., Giger, U., Kappmeyer, L., Knowles, D., 1998. Seroprevalence of *Babesia equi* among horses in Israel using competitive inhibition ELISA and IFA assays. *Vet Parasitol* 76, 251-259.
- Short, M.A., Clark, C.K., Harvey, J.W., Wenzlow, N., Hawkins, I.K., Allred, D.R., Knowles, D.P., Corn, J.L., Grause, J.F., Hennager, S.G., Kitchen, D.L., Traub-Dargatz, J.L., 2012. Outbreak of equine piroplasmosis in Florida. *J Am Vet Med Assoc* 240, 588-595.
- Sigg, L., Gerber, V., Gottstein, B., Doherr, M.G., Frey, C.F., 2010. Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in the Swiss horse population. *Parasitol Int* 59, 313-317.
- Silvey, R.E., 1996. Babesiosis in a foal. *Vet Rec* 139, 428.
- Singh, B., Banerjee, D. P., Gautam, O. P., 1980. Comparative efficacy of diminazene diaceturate and imidocarb dipropionate against *Babesia equi* infection in donkeys. *Vet Parasitol* 7, 173-179.
- Sonenshine, E.D., 1991. Biology of ticks. Oxford University Press, New York.
- Song, J., Song, R., Wang, P., Zhang, Y., Yan, Y., Zhou, J., Chahan, B., Liao, M., 2020. Preparation of monoclonal antibody against EMA-1 and development of rapid serological detection method for *Theileria equi* infection, Xinjiang, China. *J Parasitol* 106, 283-290.
- Steinman, A., Zimmerman, T., Klement, E., Lensky, I.M., Berlin, D., Gottlieb, Y., Baneth, G., 2012. Demographic and environmental risk factors for infection by *Theileria equi* in 590 horses in Israel. *Vet Parasitol* 187, 558-562.
- Sumbria, D., Das Singla, L., Sharma, A., 2016a. *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection of equids in Punjab, India: a serological and molecular survey. *Trop Anim Health Pro* 48, 45-52.
- Sumbria, D., Singla, L.D., Kaur, P., 2018. Sero-prevalence and risk factor analysis of *Theileria equi* infection in equids from different agro-climatic zones of Punjab (India) by indirect immunofluorescence antibody test. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 13, 18-20.
- Sumbria, D., Singla, L.D., Kumar, S., Sharma, A., Dahiya, R.K., Setia, R., 2016b. Spatial distribution, risk factors and haemato-biochemical alterations associated with *Theileria equi* infected equids of Punjab (India) diagnosed by indirect ELISA and nested PCR. *Acta Trop* 155, 104-112.
- Sunday Idoko, I., Tirosh-Levy, S., Leszkowicz Mazuz, M., Mohammed Adam, B., Sikiti Garba, B., Wesley Nafarnda, D., Steinman, A., 2020. Genetic characterization of piroplasms in donkeys and horses from Nigeria. *Animals* 10, 324.
- Takeet, M., Adeleye, A., Adebayo, O.O., Akande, A., 2010. Haematology and serum biochemical alteration in stress induced equine theileriosis. A case report. *Science World Journal* 4.
- Tayebwa, D.S., Tuvshintulga, B., Guswanto, A., Nugraha, A.B., Batiha, G.E., Gantuya, S., Rizk, M.A., Vudriko, P., Sivakumar, T., Yokoyama, N., Igarashi, I., 2018. The effects of nitidine chloride and camptothecin on the growth of *Babesia* and *Theileria* parasites. *Ticks Tick Borne Dis* 9, 1192-1201.
- Taylor, W.M., Bryant, J.E., Anderson, J.B., Willers, K.H., 1969. Equine piroplasmosis in the United States—a review. *J Am Vet Med Assoc* 155, 915-919.
- Tenter, A.M., Friedhoff, K.T., 1986. Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. *Vet Parasitol* 20, 49-61.
- Thompson, P.H., 1969. Ticks as vectors of equine piroplasmosis. *J Am Vet Med Assoc* 155, 454-457.
- Tirosh-Levy, S., Gottlieb, Y., Mimoun, L., Mazuz, M.L., Steinman, A., 2020a. Transplacental transmission of *Theileria equi* is not a common cause of abortions and infection of foals in Israel. *Animals (Basel)* 10.
- Tirosh-Levy, S., Gottlieb, Y., Steinman, A., 2020b. Stress conditions do not affect *Theileria equi* parasitemia levels in sub-clinically infected horses. *Ticks Tick Borne Dis*, 101384.
- Tirosh-Levy, S., Steinman, A., Levy, H., Katz, Y., Shtilman, M., Gottlieb, Y., 2020c. Parasite load and genotype are associated with clinical outcome of piroplasm-infected equines in Israel. *Parasit Vectors* 13, 267.
- Ueti, M.W., Knowles, D. P., 2018. Equine Piroplasmosis, In: Parasitic protozoa of farm animals and pets. Springer, Heidelberg, Germany, pp. 259-269.

- Ueti, M.W., Mealey, R.H., Kappmeyer, L.S., White, S.N., Kumpula-McWhirter, N., Pelzel, A.M., Grause, J.F., Bunn, T.O., Schwartz, A., Traub-Dargatz, J.L., Hendrickson, A., Espy, B., Guthrie, A.J., Fowler, W.K., Knowles, D.P., 2012. Re-emergence of the Apicomplexan *Theileria equi* in the United States: elimination of persistent infection and transmission risk. *Plos One* 7.
- Ueti, M.W., Palmer, G.H., Kappmeyer, L.S., Scoles, G.A., Knowles, D.P., 2003. Expression of equi merozoite antigen 2 during development of *Babesia equi* in the midgut and salivary gland of the vector tick *Boophilus microplus*. *J Clin Microbiol* 41, 5803-5809.
- Ueti, M.W., Palmer, G.H., Kappmeyer, L.S., Statfield, M., Scoles, G.A., Knowles, D.P., 2005. Ability of the vector tick *Boophilus microplus* to acquire and transmit *Babesia equi* following feeding on chronically infected horses with low-level parasitemia. *J Clin Microbiol* 43, 3755-3759.
- Ueti, M.W., Palmer, G.H., Scoles, G.A., Kappmeyer, L.S., Knowles, D.P., 2008. Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the apicomplexan parasite *Babesia equi*. *Infect Immun* 76, 3525-3529.
- Uilenberg, G., 2006. Babesia--a historical overview. *Vet Parasitol* 138, 3-10.
- Uilenberg, G., Gray, J., Kahl, O., 2018. Research on Piroplasmorida and other tick-borne agents: are we going the right way? *Ticks Tick Borne Dis* 9, 860-863.
- Valera, M., Molina, A., Gutiérrez, J.P., Gómez, J., Goyache, F., 2005. Pedigree analysis in the Andalusian horse: population structure, genetic variability and influence of the Carthusian strain. *Livestock Production Science* 95, 57-66.
- Vanwambeke, S.O., Sumilo, D., Bormane, A., Lambin, E.F., Randolph, S.E., 2010. Landscape predictors of tick-borne encephalitis in Latvia: land cover, land use, and land ownership. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10, 497-506.
- Vet+i, 2015. Guía de uso responsable de medicamentos veterinarios: équidos. https://www.vetresponsable.es/vetresponsable/guias-de-uso-responsable-por-especie-animal/guia-sobre-equino_3929_340_4075_0_1_in.html
- Vieira, M.I.B., Costa, M.M., de Oliveira, M.T., Goncalves, L.R., Andre, M.R., Machado, R.Z., 2018. Serological detection and molecular characterization of piroplasmids in equids in Brazil. *Acta Trop* 179, 81-87.
- Vieira, T.S., Vieira, R.F., Finger, M.A., Nascimento, D.A., Sicupira, P.M., Dutra, L.H., Deconto, I., Barros-Filho, I.R., Dornbusch, P.T., Biondo, A.W., Vidotto, O., 2013. Seroepidemiological survey of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from a rural and from urban areas of Parana State, southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 4, 537-541.
- Vila, A., Estrada-Pena, A., Altet, L., Cusco, A., Dandrea, S., Francino, O., Halos, L., Roura, X., 2019. Endosymbionts carried by ticks feeding on dogs in Spain. *Ticks Tick Borne Dis* 10, 848-852.
- Wang, J., Liu, J., Yang, J., Wang, X., Li, Z., Jianlin, X., Li, X., Xiang, Q., Li, Y., Liu, Z., Luo, J., Guan, G., Yin, H., 2019a. The first molecular detection and genetic diversity of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses of Gansu province, China. *Ticks Tick Borne Dis* 10, 528-532.
- Wang, M., Guo, W., Igarashi, I., Xuan, X., Wang, X., Xiang, W., Jia, H., 2014. Epidemiological investigation of equine piroplasmosis in China by enzyme-linked immunosorbent assays. *J Vet Med Sci* 76, 549-552.
- Wang, P., Song, J., Song, R., Zhang, M., Wu, L., Li, F., Yan, Y., Zhou, J., Chahan, B., Liao, M., 2019b. Preparation of monoclonal antibodies against Bc48 and development of a rapid detection assay for infection with *Babesia caballi* in China. *Folia Parasitol (Praha)* 66.
- Weiland, G., 1986. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Vet Parasitol* 20, 43-48.
- Wise, L.N., Kappmeyer, L.S., Mealey, R.H., Knowles, D.P., 2013. Review of equine piroplasmosis. *J Vet Intern Med* 27, 1334-1346.
- Wise, L.N., Knowles, D. P., Rothschild, C. M., 2014. Piroplasmosis, In: *Equine Infectious Diseases (Second Edition)*. Saunders ELSEVIER, Missouri, pp. 467-475.
- Wise, L.N., Pelzel-McCluskey, A.M., Mealey, R.H., Knowles, D.P., 2014. Equine piroplasmosis. *Vet Clin North Am Equine Pract* 30, 677-693.
- Ybanez, A.P., Ybanez, R.H.D., Talle, M.G., Arreglo, R.M.T., Geens, M.J.C., Villas, J.G.I., 3rd, Villar, S.R., Laruga, C.L., Cao, S., Moumouni, F.P.A., Liu, M., Igarashi, I., Xuan, X., 2018. Serological and molecular detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Philippine horses. *Ticks Tick Borne Dis* 9, 1125-1128.
- Zanet, S., Bassano, M., Trisciuglio, A., Taricco, I., Ferroglio, E., 2017. Horses infected by piroplasms different from *Babesia caballi* and *Theileria equi*: species identification and risk factors analysis in Italy. *Vet Parasitol* 236, 38-41.

- Zobba, R., Ardu, M., Niccolini, S., Chessa, B., Manna, L., Cocco, R., Parpaglia, M.L.P., 2008. Clinical and laboratory findings in equine piroplasmiasis. *J Equine Vet Sci* 28, 301-308.
- Zweygarth, E., Just, M.C., DeWaal, D.T., 1997. In vitro cultivation of *Babesia equi*: detection of carrier animals and isolation of parasites. *Onderstepoort J Vet* 64, 51-56.
- Zweygarth, E., Lopez-Rebollar, L.M., Meyer, P., 2002a. In vitro isolation of equine piroplasms derived from Cape Mountain zebra (*Equus zebra zebra*) in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 69, 197-200.
- Zweygarth, E., Lopez-Rebollar, L.M., Nurton, J., Guthrie, A.J., 2002b. Culture, isolation and propagation of *Babesia caballi* from naturally infected horses. *Parasitol Res* 88, 460-462.
- Zweygarth, E., van Niekerk, C.J., de Waal, D.T., 1999. Continuous in vitro cultivation of *Babesia caballi* in serum-free medium. *Parasitol Res* 85, 413-416.

9. ANEXOS

9.1 Lista de acrónimos y abreviaturas

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

AIE: anemia infecciosa equina.

ALP: fosfatasa alcalina.

ANCCE: Asociación Nacional de Criadores de Caballos de Pura Raza Españoles.

APHIS: *Animal and Plant Health Inspection Service*.

ARCA: Sistema Nacional de Información de Razas.

AST: aspartato aminotransferasa.

AVE: arteritis vírica equina.

B. caballi: *Babesia caballi*.

BD: bilirrubina directa.

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*.

BT: bilirrubina total.

CCAA: Comunidad Autónoma.

cELISA: ELISA de competición.

Células NK: células *natural killer*.

CEXGAN: Comercio Exterior Ganadero.

CFT: *complement fixation test*.

CK: creatina quinasa.

Cq: ciclo de cuantificación.

cytB: citocromo B mitocondrial.

DI: dipropionato de imidocarb.

DO: densidad óptica.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EEUU: Estados Unidos.

EMA: *equi merozoite antigen*.

EP: *equine piroplasmosis*.

FC: fijación del complemento.

FENACE: Federación de Asociaciones de Ganaderos de Caballo Español.

GB: glóbulos blancos.

GGT: gamma glutamil transferasa.

GR: glóbulos rojos.

Hb: *hemoglobin*.

Hg: hemoglobina.

Htc: hematocrito.

iELISA: ELISA indirecto.

IFI: inmunofluorescencia indirecta.

IgG: inmunoglobulina G.

IgM: inmunoglobulina M.

LAMP: *loop-mediated isothermal amplification*.

LDH: lactato deshidrogenasa.

MAGRAMA: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*.

nPCR: PCR anidada.

NVSL: *National Veterinary Services Laboratories*.

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal.

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PCV: *packed cell volume*.

PE: piroplasmosis equina.

P.R.E: Pura Raza Español.

qPCR: PCR cuantitativa o a tiempo real.

R²: coeficiente de regresión.

RAP: *rhostry associated protein*.

RBC: *red blood cell*.

RLB: *reverse line blot hybridization*.

rpm: revoluciones por minuto.

SITRAN: Sistema Integral de Trazabilidad Animal.

SP: *Spanish Purebred*.

TB: *total bilirubin*.

T. equi: *Theileria equi*.

UELN: *Universal Equine Life Number*.

USDA: *United States Department of Agriculture*.

Vet+i: Plataforma Tecnológica Española de Sanidad Animal.

WBC: *white blood cell*.

9.2 Lista de tablas

Tabla 1. Censo de caballos y de explotaciones equinas por CCAA.

Tabla 2. Número de caballos y de ganaderías activas P.R.E registradas por CCAA.

Tabla 3. Garrapatas transmisoras de piroplasmosis equina: localización geográfica y piroplasma equino transmitido.

Tabla 4. Estudios de seroprevalencia de piroplasmosis equina publicados en distintos países del mundo.

Tabla 5. Estudios de prevalencia de piroplasmosis equina publicados en distintos países del mundo.

Tabla 6. Factores de riesgo asociados y no asociados con una mayor infección de piroplasmosis equina.

Tabla 7. Intervalos de referencia utilizados en la evaluación de los parámetros hematológicos.

Tabla 8. Intervalos de referencia utilizados en la evaluación de los parámetros bioquímicos.

Tabla 9. Secuencias de los cebadores y sondas empleados para amplificar el gen 18S rRNA de *Theileria equi* y *Babesia caballi*.

9.3 Lista de figuras

Figura 1. Ciclo biológico de *Babesia caballi* en el vector y en el hospedador vertebrado.

Figura 2. Ciclo biológico de *Theileria equi* en el vector y en el hospedador vertebrado.

Figura 3. Ciclo biológico (A) y formas de transmisión de las garrapatas: intraestadial (B), transestadial (C) y transovárica (D).

Figura 4. Posibles vías de transmisión de la piroplasmosis equina.

Figura 5. Distribución global de la piroplasmosis equina en el año 2019.

Figura 6. Frotis sanguíneo de un caballo parasitado con *Babesia caballi* (A) y con *Theileria equi* (B) (Diff-Quick, 100x).

Figura 7. Cultivo *in vitro*: placa de cultivo celular en cámara incubadora con mezcla de gases.

Figura 8. Coloración de los pocillos tras la realización de los kits cELISA.

Figura 9. Resultado final de la técnica fijación del complemento.

Figura 10. Analizador automático de hematología.

Figura 11. Analizador automático de bioquímica.

9.4 Estancias internacionales

- *Institute of Biodiversity, Animal Health and Comparative Medicine, University of Glasgow, United Kingdom.*

Supervisor: Robert M Coultous.

Periodo: 15 de septiembre al 17 de diciembre de 2019.

9.5 Comunicaciones orales en congresos

- **“Estudio de seroprevalencia de piroplasmosis equina en España en muestras previas a la exportación”.**

Eliazar Camino, Kelly Alejandra Carvajal, Francisco Lozano, Cristina Viñolo, Tatiana Alende, Lucas Domínguez y Fátima Cruz. XXI Simposio Anual de la Asociación de Veterinarios Especialistas en Diagnóstico de Laboratorio AVEDILA. Murcia (España). 17-18 de noviembre de 2016.

- **“Análisis comparativo de distintas técnicas diagnósticas en casos con sospecha clínica de piroplasmosis equina”.**

Eliazar Camino, Kelly Alejandra Carvajal, Iván Martín-Basconcillos, Aránzazu Buendía y Fátima Cruz. XXII Simposio Anual de la Asociación de Veterinarios Especialistas en Diagnóstico de Laboratorio AVEDILA. Valladolid (España). 16-17 de noviembre de 2017.

- **“Piroplasmosis equina en caballos P.R.E de cría en Madrid: seroprevalencia y factores de riesgo asociados”.**

Eliazar Camino, Kelly Alejandra Carvajal, Cristina Viñolo, Francisco Lozano, Tatiana Alende, Aránzazu Buendía y Fátima Cruz. III Congreso Internacional de Medicina Deportiva Equina. Madrid (España). 22-24 de noviembre de 2017.

- **“Diagnóstico laboratorial de Piroplasmosis equina en caballos con sospecha clínica: elección de la técnica apropiada”.**

Eliazar Camino. IV Jornadas de Investigación en doctorado – PhDay Complutense. Facultad de Veterinaria, UCM. 27 de junio de 2018.

- **“Situación actual y factores de riesgo asociados con la piroplasmosis equina en caballos de deporte en España”.**
Eliazar Camino, Paloma Gago, Ana Sánchez, Kelly Alejandra Carvajal, Paloma Forés, Lucía de Juan, Fátima Cruz. IV Congreso Internacional de Medicina Deportiva Equina. Madrid (España). 28-29 de noviembre de 2019.
- **“Haematological findings related to acute and chronic (asymptomatic) equine piroplasmosis”.**
Eliazar Camino, Abel Dorrego, Paloma Gago, Lucía de Juan, Lucas Domínguez y Fátima Cruz. European Society of Veterinary Clinical Pathology (ESVCP) Annual Congress 2020. On-line. 24-27 de junio de 2020.

9.6 Artículos de divulgación

- **“Piroplasmosis equina”.**
Eliazar Camino y Fátima Cruz. Revista VISAVET Divulgación. 3 de abril de 2017.
- **“Cultivo *in vitro* de *Theileria equi* y *Babesia caballi*”.**
Eliazar Camino, Kelly Alejandra Carvajal, Aránzazu Buendía, Abel Dorrego y Fátima Cruz. Revista VISAVET Divulgación. 4 de octubre de 2018.
- **“Seroprevalencia de piroplasmosis equina en caballos con destino exportación”.**
Eliazar Camino, Kelly Alejandra Carvajal, Francisco Javier Lozano, Cristina Viñolo, Lucas Domínguez y Fátima Cruz. Revista VISAVET Divulgación. 20 de julio de 2020.

9.7 Colaboración en tareas docentes

- Parasitología curso 2017-2018 (24 horas).
- Parasitología curso 2018-2019 (24 horas).
- Enfermedades Parasitarias curso 2018-2019 (24 horas).
- Parasitología curso 2019-2020 (24 horas).
- Proyecto número 219 de Innova-Docencia (año 2017):
"Infequus: plataforma de enfermedades infecciosas equinas".

9.8 Organización de eventos científicos

- Comité organizador de las V Jornadas de Investigación en doctorado – PhDay Complutense. Facultad de Veterinaria, UCM. 27 de junio de 2019.