



**TESIS DOCTORAL**

**APORTACIONES AL DIAGNÓSTICO  
SEROLÓGICO Y MOLECULAR DE  
LA PIROPLASMOSIS EQUINA**

**M<sup>a</sup> GUADALUPE MONTES CORTÉS**

**Programa de Doctorado en Salud Pública y Animal (R005)**

**2019**





**TESIS DOCTORAL**

**Aportaciones al diagnóstico serológico y molecular de la  
piroplasmosis equina**

**M<sup>a</sup> Guadalupe Montes Cortés**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA Y ANIMAL  
(R005)**

**Conformidad de los directores**

**Fdo. Miguel Ángel Habela Martínez-Estélez**

**Fdo. José Luis Fernández García**

**2019**





**TESIS DOCTORAL**

**Aportaciones al diagnóstico serológico y molecular de la  
piroplasmosis equina**

**M<sup>a</sup> Guadalupe Montes Cortés**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA Y ANIMAL  
(R005)**

En Cáceres, a 08 de enero de 2019

Fdo. María Guadalupe Montes Cortés

**2019**





## DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

Campus Universitario  
Avenida de la Universidad, s/n  
E-10071 – CÁCERES  
Teléfonos: +34 (9) 25 71 30  
Fax: +34 (9) 27 25 71 10

D. Miguel Ángel Habela Martínez-Estélez, Doctor en Veterinaria y Profesor Titular de Universidad adscrito al área de Parasitología del Departamento de Sanidad Animal, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura,

### INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Aportaciones al diagnóstico serológico y molecular de la piroplasmosis equina”**, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria D<sup>a</sup>. María Guadalupe Montes Cortés, ha sido realizada en la Facultad de Veterinaria en la Universidad de Extremadura bajo mi dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctora.

En Cáceres, a 08 de enero de 2019

Fdo. Miguel Ángel Habela Martínez-Estélez





**DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

Campus Universitario de Cáceres  
Avenida de la Universidad. *s/n*  
E-10071 -CÁCERES  
Teléfonos: +34 (9) 25 71 05  
Fax:+34 (9) 27 25 71 10

D. José Luis Fernández García doctor en Veterinaria y Profesor Titular de Universidad adscrito al área de Producción Animal del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura,

**INFORMA:**

Que la Tesis Doctoral titulada "**Aportaciones al diagnóstico serológico y molecular de la piroplasmosis equina**", de la que es autora la licenciada en Veterinaria D<sup>a</sup>. María Guadalupe Montes Cortés, ha sido realizada en la Facultad de Veterinaria de Cáceres en la Universidad de Extremadura bajo mi dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctora.

En Cáceres, a 08 de enero de 2019

Fdo. José Luis Fernández García





## DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

Campus Universitario  
Avenida de la Universidad, s/n  
E-10071 – CÁCERES  
Teléfonos: +34 (9) 25 71 30  
Fax: +34 (9) 27 25 71 10

La presente tesis doctoral está elaborada según el formato de compendio de publicaciones conforme a la Resolución de 18 de febrero de 2014, por la que se aprueba la Normativa Reguladora de los Estudios de Doctorado (DOE de 6 de marzo de 2014), e incluye los siguientes artículos publicados en revistas científicas internacionales indexadas en el Journal Citation Reports (JCR):

### **1.- «Genetic variation of the $\beta$ -tubulin gene of *Babesia caballi* strains»**

M<sup>a</sup> Guadalupe Montes Cortés, José Luis Fernández-García, Miguel Ángel Habela Martínez-Estélez

Journal Arthropod-Borne Diseases, September 2017, 11(3): 334-353

Factor de impacto JCR actual (2017/2018): 1,231

### **2.- «Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Spain»**

M<sup>a</sup> Guadalupe Montes Cortés, José Luis Fernández-García, Miguel Ángel Habela Martínez-Estélez

Parasite 2017; 24:14. DOI: <https://doi.org/10.1051/parasite/2017015>

Factor de impacto JCR actual (2017): 2,069

### **3.- «A multinested-PCR for detection of equine piroplasmids *Babesia caballi* and *Theileria equi*»**

M<sup>a</sup> Guadalupe Montes Cortés, José Luis Fernández-García, Miguel Ángel Habela Martínez-Estélez

Ticks and Tick-borne Diseases DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.008>

Artículo aceptado el día 10 de noviembre de 2018 y publicado online el día 13 de noviembre de 2018

Factor de impacto JCR actual (2017): 2,612



La realización de parte de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a que la doctoranda ha disfrutado de una beca de investigación de la Universidad de Extremadura en base a la Resolución de la acción II (Becas de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación para no Doctores) dentro del II Plan de Iniciación de la Universidad de Extremadura (2006-2007), así como a la ayuda económica prestada por la Junta de Extremadura, Consejería de Economía e Infraestructuras -Ayuda GR15085- y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), para la publicación del estudio II: «Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Spain».

The logo consists of a solid green horizontal rectangle with the text "JUNTA DE EXTREMADURA" written in white, uppercase, sans-serif font, centered within the rectangle.

**JUNTA DE EXTREMADURA**

Consejería de Economía e Infraestructuras





*A mis padres*



*“Nunca he creído que por ser mujer deba tener tratos especiales, de creerlo estaría reconociendo que soy inferior a los hombres, y no soy inferior a ninguno de ellos”*

*Marie Curie*



# Índices

---



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de abreviaturas y acrónimos.....	vii
Índice de figuras.....	ix
Índice de tablas.....	x
Resumen.....	xi
Summary.....	xvii
<b>1.- Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1.- Introducción.....	3
1.2.- Justificación y objetivos.....	7
<b>2.- Revisión bibliográfica.....</b>	<b>11</b>
2.1.- Antecedentes.....	13
2.2.- Sistemática.....	15
2.2.1.- Taxonomía de <i>Babesia caballi</i> .....	16
2.2.2.- Filogenia de <i>Babesia caballi</i> .....	16
2.2.3.- Taxonomía de <i>Theileria equi</i> .....	19
2.2.4.- Filogenia de <i>Theileria equi</i> .....	20
2.3.- Ciclo biológico de los piroplásmidos equinos.....	25
2.3.1.- Ciclo biológico de <i>Babesia caballi</i> .....	25
2.3.2.- Ciclo biológico de <i>Theileria equi</i> .....	28
2.4.- Contagio de la Piroplasmosis Equina.....	31
2.5.- Distribución geográfica y prevalencia.....	34
2.6.- Diagnóstico de la Piroplasmosis Equina.....	42
2.6.1.- Diagnóstico clínico-epidemiológico.....	42
2.6.2.- Diagnóstico parasitológico directo.....	46
2.6.2.1.- Parasitoscopia.....	46
2.6.2.2.- Cultivo <i>in vitro</i> .....	47
2.6.2.3.- Métodos moleculares: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)..	48
2.6.2.3.1.- Principales variantes de la PCR .....	51
2.6.2.3.2.- Principales genes empleados en el diagnóstico molecular de la Piroplasmosis Equina.....	56

2.6.3.- Diagnóstico parasitológico indirecto.....	60
2.6.3.1.- Reacción de Fijación de Complemento (RFC).....	61
2.6.3.2.- Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	62
2.6.3.3.- Técnica Inmunoenzimática (ELISA).....	64
2.6.3.4.- Test de Aglutinación en Látex (LAT).....	68
2.6.3.5.- Western Blot o Inmunoblot (WB).....	68
2.6.3.6.- Inmunocromatografía (ICT).....	69
2.6.4.- Diagnóstico diferencial.....	70
2.7.- Vectores potenciales de la Piroplasmosis Equina.....	73
2.7.1.- Género <i>Dermacentor</i> .....	74
2.7.2.- Género <i>Hyalomma</i> .....	75
2.7.3.- Género <i>Rhipicephalus</i> .....	76
<b>3.- Estudios publicados.....</b>	<b>79</b>
3.1.- Estudio I: «Genetic variation of the $\beta$ -tubulin gene of <i>Babesia caballi</i> strains».....	81
3.2.- Estudio II: «Seroprevalence of <i>Theileria equi</i> and <i>Babesia caballi</i> in horses in Spain».....	93
3.3.- Estudio III: «A multinested-PCR for detection of the equine piroplasmids <i>Babesia caballi</i> and <i>Theileria equi</i> ».....	113
<b>4.- Materiales y métodos.....</b>	<b>115</b>
4.1.- Estudio I: «Genetic variation of the $\beta$ -tubulin gene of <i>Babesia caballi</i> strains».....	117
4.2.- Estudio II: «Seroprevalence of <i>Theileria equi</i> and <i>Babesia caballi</i> in horses in Spain».....	119
4.3.- Estudio III: «A multinested-PCR for detection of the equine piroplasmids <i>Babesia caballi</i> and <i>Theileria equi</i> ».....	121
<b>5.- Resultados.....</b>	<b>125</b>
5.1.- Aportaciones al conocimiento genético de <i>Babesia caballi</i> .....	127
5.2.- Estudio epidemiológico de la Piroplasmosis Equina.....	129
5.3.- Desarrollo de la técnica PCR múltiple y anidada para el diagnóstico de la Piroplasmosis Equina .....	132
5.4.- Comparación entre técnicas serológicas y moleculares de diagnóstico en Piroplasmosis Equina.....	134

---

<b>6.-</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>135</b>
6.1.-	Aportaciones al conocimiento genético de <i>Babesia caballi</i> .....	137
6.2.-	Estudio epidemiológico de la Piroplasmosis Equina en España.....	140
6.3.-	Desarrollo de la técnica PCR múltiple y anidada para el diagnóstico de la Piroplasmosis Equina.....	147
6.4.-	Comparación entre técnicas serológicas y moleculares de diagnóstico en Piroplasmosis Equina.....	152
<b>7.-</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>157</b>
<b>8.-</b>	<b>Agradecimientos.....</b>	<b>161</b>
<b>9.-</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>167</b>
<b>10.-</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>219</b>
10.1.-	Anexo I.....	221
10.2.-	Anexo II.....	223
10.3.-	Anexo III.....	225
10.4.-	Anexo IV.....	227



## Índice de abreviaturas y acrónimos

Abreviaturas y acrónimos por orden alfabético

**Ac:** Anticuerpos

**Ag:** Antígeno

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

***B. caballi:*** *Babesia caballi*

***B. equi:*** *Babesia equi*

***BC48 (sin. RAP-1):*** Gen de la Proteína Asociada a la Roptria-1 de *B. caballi*

**cELISA:** ELISA competitiva

**CFSPH:** Center for Food Security and Public Health

***CytB:*** Gen Citocromo B mitocondrial

**DAFF:** Department of Agriculture, Forestry and Fisheries of Republic of South Africa

***D. marginatus:*** *Dermacentor marginatus*

**ELISA:** del inglés “Enzyme-LinkedImmunoSorbent Assay” o Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

***EMA-1:*** Gen del antígeno-1 del merozoíto de *T. equi*

***EMA-2:*** Gen del antígeno-2 del merozoíto de *T. equi*

***EMA-3:*** Gen del antígeno-3 del merozoíto de *T. equi*

**ES:** Error estándar

**EEUU:** Estados Unidos de América

**FAO:** del inglés “Food and Agriculture Organization” u Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

***H. lusitanicum:*** *Hyalomma lusitanicum*

***H. m. marginatum:*** *Hyalomma marginatum marginatum*

**IC:** Intervalo de confianza

**IFI:** Inmunofluorescencia Indirecta

**LAMP:** del inglés “Loop-mediated isothermal amplification” o Amplificación Isotérmica de forma Cíclica

**mMPSA:** Antígeno Mayor de Superficie del Merozoíto.

**mPCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple

**mn-PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple y anidada

**mRT-PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple y en Tiempo Real

**NCBI:** del inglés “National Center for Biotechnology Information” o Centro Nacional para la Información Biotecnológica.

**nPCR:** Reacción en cadena de la Polimerasa anidada

**OCW:** OpenCourseWare

**OIE:** Organización Mundial de Sanidad Animal (antes Oficina Internacional de Epizootias)

**OR:** Odds Ratio o valores de riesgo

**p:** *p*-valor o valor *p*

**pb:** pares de bases nucleotídicas

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**PCR-RFLP:** Reacción en Cadena de la Polimerasa y análisis del Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción

**PCR-RLB:** del inglés “Reverse Line Blot” o Reacción en Cadena de la Polimerasa asociada a Hibridación Reversa en Línea

**PE:** Piroplasmosis Equina

**PRE:** Caballo Pura Raza Española

**PRA:** Caballo Pura Raza Árabe

**PSI:** Caballo Pura Sangre Inglés

**qPCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa

***R. bursa:*** *Rhipicephalus bursa*

***RAP-1 (sin. BC48):*** Gen de la Proteína Asociada a la Roptria-1 de *B. caballi*

**RFC:** Reacción de Fijación de Complemento

**RT-PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

**RT-qPCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real

***T. equi:*** *Theileria equi*

**EEUU:** Estados Unidos de América

**UBA:** Universidad de Buenos Aires

**WB:** Western blot

***β-tubulina:*** Gen de la beta-tubulina

***18S rRNA:*** Gen 18S del ácido ribonucleico ribosómico

## Índice de figuras

**Figura 1:** Merozoítos de *B. caballi*

**Figura 2:** Ciclo biológico de *B. caballi*

**Figura 3:** Merozoítos de *Theileria equi*

**Figura 4:** Ciclo biológico de *T. equi*

**Figura 5:** Mucosas ictéricas de un caballo infectado por *T. equi*

**Figura 6:** Placa de cultivo

**Figura 7:** Frasco de cultivo (Flask)

**Figura 8:** Seropositividad a *T. equi* por Inmunofluorescencia Indirecta (Dilución 1:1280)

**Figura 9:** Placa de cELISA lista para la lectura cromatográfica

**Figura 10:** Vista dorsal de una hembra de *D. marginatus*

**Figura 11:** Vista dorsal de un macho de *D. marginatus*

**Figura 12:** Vista dorsal de una hembra de *H. m. marginatum*

**Figura 13:** Vista dorsal de un macho de *H. m. marginatum*

**Figura 14:** Vista dorsal de una hembra de *H. lusitanicum*

**Figura 15:** Vista dorsal de un macho de *H. lusitanicum*

**Figura 16:** Vista dorsal de una hembra de *R. bursa*

**Figura 17:** Vista dorsal de un macho de *R. bursa*

## Índice de tablas

**Tabla 1:** Datos recopilados sobre la prevalencia de *B. caballi* y *T. equi* en África

**Tabla 2:** Datos recopilados sobre la prevalencia de *B. caballi* y *T. equi* en Asia

**Tabla 3:** Datos recopilados sobre la prevalencia de *B. caballi* y *T. equi* en Sudamérica y Centroamérica

**Tabla 4:** Datos recopilados sobre la prevalencia de *B. caballi* y *T. equi* en Norteamérica

**Tabla 5:** Datos recopilados sobre la prevalencia de *B. caballi* y *T. equi* en Europa

**Tabla 6:** Datos recopilados sobre la prevalencia de *B. caballi* y *T. equi* en España

# Resumen

---



## Resumen

La Piroplasmosis Equina (PE) es una enfermedad muy extendida en una gran cantidad de países tropicales, subtropicales y de clima templado, entre los que se encuentra España. Esta parasitosis genera cuantiosas pérdidas económicas, pues reduce y dificulta el libre comercio y tránsito de los équidos entre países.

Era obvia la necesidad de actualizar los conocimientos sobre esta parasitosis en nuestro país, para ello, se realizó un estudio epidemiológico con objeto de llegar a conocer su seroprevalencia, analizándose 3100 muestras de sueros de equinos de diferentes procedencias regionales. La metodología diagnóstica empleada fue la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), cuyos resultados permitieron mejorar la información aportada por los datos obtenidos en estudios previos, relativos a la presencia y distribución de esta enfermedad. Este estudio se ha desarrollado entre febrero y septiembre de 2014, muestreando una amplia zona de la geografía española que incluía 5 comunidades autónomas y 22 provincias (40% del total de ellas). Por lo tanto, creemos que se muestra una imagen significativa y bastante fiel de la realidad epidemiológica de esta hemoparasitosis en España. Se ha corroborado que la seroprevalencia detectada era bastante elevada, superior al 50%. Hemos constatado que la seroprevalencia de *Theileria equi* (44,55%) era superior a la de *Babesia caballi* (20,74%), con la particularidad que esta última tiende a predominar en el norte de la Península Ibérica. Además, se compararon los resultados obtenidos por las técnicas IFI y cELISA (VMRD<sup>®</sup>, Inc, Pullman, WA, USA) calculando el índice  $\kappa$  de Cohen, el cual permitió obtener el grado de concordancia entre los dos métodos diagnósticos. Para *T. equi* se ha obtenido un grado de acuerdo sustancial ( $\kappa=0,68$ ). En cambio, en el caso de *B. caballi*, el grado de acuerdo fue discreto ( $\kappa=0,22$ ).

Adicionalmente, se ha desarrollado una técnica novedosa para el diagnóstico de la PE que reunía la PCR múltiple y la nested PCR o PCR anidada, a la cual se denominó PCR múltiple anidada (mn-PCR). Se diseñaron siete parejas de cebadores para el diagnóstico de *T. equi* y *B. caballi*. El diseño se realizó usando la información molecular disponible en la base de datos de secuencias genéticas del NCBI. Así, se descargaron secuencias de distintos loci génicos: *18S rRNA*,  *$\beta$ -tubulina*, *EMA-1* y citocromo B (*cytB*) en el caso de *T. equi* y *18S rRNA*,  *$\beta$ -tubulina* y *RAP-1* para *B. caballi*, respectivamente. Este método fue eficaz en la detección de ambos parásitos,

revelando una prevalencia total elevada (72,77%). Al igual que sucedía con la IFI, la prevalencia para *T. equi* fue superior (65,96%) a la detectada para *B. caballi* (29,36%). Los resultados de mn-PCR se compararon con los obtenidos mediante cELISA, siguiendo la misma metodología empleada en la investigación epidemiológica. Los resultados de la comparación confirmaron lo ya obtenido en el estudio previo, ya que el valor del índice  $\kappa$  de Cohen para *T. equi* ( $\kappa=0,83$ ) resultó muy superior al obtenido para *B. caballi* ( $\kappa=0,06$ ). Este hecho nos permitió concluir que la técnica cELISA fue menos eficaz para la detección de *B. caballi* en nuestro país, y por ello, sus resultados deben tomarse con cautela respecto a este parásito. El problema podría haber radicado en la existencia de una gran variabilidad genética en esta especie de protozoo. Para mostrar esto, se secuenció un fragmento del gen *RAP-1* de *B. caballi* de tres muestras de sangre procedentes de caballos infectados con este parásito, procedentes de distintas áreas geográficas (Málaga, Cáceres y Segovia). Las tres muestras analizadas tuvieron la misma secuencia genética del gen *RAP-1*, que además resultó ser idéntica a secuencias procedentes de Israel. Muy sucintamente, el análisis filogenético mostró una clara separación en dos grandes superclados en base a la variación molecular del gen *RAP-1*. Por un lado, el superclado A reunió cepas o linajes de origen africano y mediterráneo (españolas e israelíes, entre otras). En el otro, el superclado B, incluyó las cepas de origen asiático y americano. De acuerdo con esta estructura filogenética, y teniendo en cuenta que el kit comercial cELISA se diseñó usando antígenos obtenidos de las cepas del superclado B, sugerimos que la diversidad genética afectaba al diagnóstico certero de las cepas españolas. En un estudio previo se había constatado la existencia de variabilidad genética en la especie *B. caballi*, ya que se aportó una nueva secuencia del gen de la  $\beta$ -*tubulina* obtenida de una cepa de origen español. En base a ambos estudios, sugerimos que dicha variabilidad podría llegar a tener cierta importancia tanto para actualizar la taxonomía de estos parásitos, como para el diagnóstico de esta enfermedad. Basándonos en la información molecular, no sólo se diseñaron unos oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen de la  $\beta$ -*tubulina* de este parásito (aplicados más tarde a la técnica mn-PCR), sino que también se diseñó una PCR-RFLP para discriminar entre las dos cepas conocidas de *B. caballi* (origen francés y español).

Por último, pero no por ello menos importante, se han estudiado los posibles factores de riesgo para la transmisión/expansión de la PE en nuestro país. Los estudios que hemos realizado, revelaron que la edad, la raza y la procedencia geográfica eran factores de riesgo para contraer esta enfermedad. Sin embargo, el color de la capa y el

sexo no estaban asociados significativamente con la seropositividad según los resultados obtenidos por IFI. Tras el análisis de los datos obtenidos por mn-PCR y cELISA, la edad destaca como un factor de riesgo para el contagio de *T. equi* (no así para *B. caballi*). El factor sexo no se asoció significativamente a la aparición de *B. caballi* y sólo mediante cELISA, resultó ser un factor de riesgo para la presencia de *T. equi*, muy posiblemente asociado al manejo.

Podemos concluir que resulta necesaria la comparación entre los métodos de diagnóstico de la PE, para determinar su eficacia en los diferentes países, pues se ha demostrado la existencia de variabilidad genética entre las cepas de distintos orígenes geográficos. Además, el estudio de la variabilidad genética puede ayudar al diseño de nuevas herramientas diagnósticas, como puede ser la mn-PCR, la cual ha permitido, al igual que la IFI y cELISA, demostrar que España es un país endémico a PE.



# Summary

---



## Summary

Equine Piroplasmosis (EP) is a widespread disease in a large number of tropical, subtropical and temperate countries, including Spain. This parasitosis causes great economic losses. Furthermore, it reduces and hinders the free trade of equids between countries.

An epidemiological study was performed to determine the seroprevalence of this disease in an extense area of Spain, due to the need to update the knowledge on this parasitic disease in our country. Thus, 3100 sera samples from different Spanish regions were analysed. The diagnostic technique used was the Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) and the results allowed to improve the information on the presence and distribution of that disease. This study was developed between February and September 2014 in a large area of the Spanish geography, 22 provinces in 5 regions. Therefore, these data provided a reasonably accurate snapshot of the epidemiological reality of this haemoparasitosis in Spain. It was corroborated that the obtained seroprevalence was quite high (higher than 50%). Also, it has been verified that the seroprevalence of *Theileria equi* (44.55%) was higher than that of *Babesia caballi* (20.74%). And *B. caballi* tends to be more frequent in the north of the Iberian Peninsula. In addition, the results obtained by the IFAT and the cELISA technique (VMRD®, Inc, Pullman, WA, USA) were compared calculating the Cohen's kappa coefficient ( $\kappa$ ), which allowed to know the concordance between the two techniques. A substantial agreement was obtained ( $\kappa = 0.68$ ) for *T. equi*. Meanwhile, the kappa value for *B. caballi* was lower than that for *T. equi* ( $\kappa = 0.22$ ), showing only a fair agreement.

In addition, a novel diagnostic technique was developed in order to diagnose EP. It combined the multiple PCR and nested PCR, which was called multinested PCR (mn-PCR). Seven primers pairs were designed for the diagnosis of *T. equi* and *B. caballi* using the molecular information available in the NCBI database. The design of these primers was made using different sequences of different gene loci: *18S rRNA*,  *$\beta$ -tubulin*, *EMA-1* and cytochrome B (*cytB*) for *T. equi* and *18S rRNA*,  *$\beta$ -tubulin* and *RAP-1* for *B. caballi*. The mn-PCR was effective in the detection of both parasites, as it detected a high overall prevalence (72.77%). The *T. equi* prevalence was higher (65.96%) than that detected for *B. caballi* (29.36%), as it was showed using the IFAT. The mn-PCR results were compared with those obtained by cELISA, using the Cohen's kappa coefficient,

the same statistic used in the epidemiological study. The results of the comparison (mn-PCR vs. cELISA) confirmed what was already obtained in the previous study (IFAT vs. cELISA), since the  $\kappa$  value for *T. equi* ( $\kappa = 0.83$ ) was much higher than that obtained for *B. caballi* ( $\kappa = 0.06$ ). Considering these results, it can be concluded that the cELISA technique was less effective for the detection of *B. caballi* in our country. Therefore, the results obtained using the cELISA commercial kit for *B. caballi* with samples from Spain should be taken with caution. The reason to explain the low performance of the *B. caballi* commercial kit would be the existence of a genetic variation in this species of protozoan. Furthermore, it was sequenced a fragment of the *B. caballi* *RAP-1* gene from three blood samples from horses infected with this parasite. These samples were collected from different geographical areas of Spain (Málaga, Cáceres and Segovia). The three samples analysed had the same genetic sequence of the *RAP-1* gene, which was identical to sequences from Israel. The phylogenetic analysis showed a clear separation in two large superclades based on the molecular variation in the *RAP-1* gene. The superclado A included the strains or lineages of African and Mediterranean origin (Spanish and Israeli, among others). The other superclade, the superclado B, included Asian and American strains. In agreement with this phylogenetic analysis, the genetic variation could be limited the accurate diagnosis of Spanish strains considering that the cELISA commercial kit was designed using antigens obtained from strains of the superclade B. Previously, our studies have confirmed the existence of genetic variability of the  $\beta$ -*tubulin* gene of *B. caballi*, since a new sequence of this gene had been provided from a Spanish strain. According to our studies, the genetic variation could become important not only when updating the taxonomy of these parasites, but also for the diagnosis of this disease. Based on the molecular PCR information, not only specific oligonucleotides were designed in the amplification of the  $\beta$ -*tubulin* gene of *B. caballi* (applied later to the mn-PCR technique), but also a PCR-RFLP was designed in order to discriminate between the two known strains of *B. caballi* (French and Spanish strains).

Last but not least, we have studied the possible risk factors for the transmission / expansion of EP in Spain. The studies that we have conducted revealed that the age, the breed and the geographical location were risk factors for this parasitic infection. However, the coat colour and the sex were not significantly associated with seropositivity according to the results obtained by IFAT. The age was a risk factor for the *T. equi* infection (not for *B. caballi*) after analysing the data obtained by mn-PCR

and cELISA. The sex was not significantly associated with the presence of *B. caballi* and only by cELISA, the sex was a risk factor associated to the *T. equi* seroprevalence.

In conclusion, it is necessary to compare the EP diagnostic methods, to determine its effectiveness detecting *B. caballi* and *T. equi* in different countries, since it has been demonstrated the existence of genetic variability between strains of different geographical locations. In addition, the study of genetic variability can help to design new diagnostic tools, such as the mn-PCR, which has allowed (as the IFAT and cELISA) to determine that Spain is an endemic country for EP.



# **1.- Introducción**

---



## 1.1.- Introducción

El caballo (*Equus ferus caballus*, Linneo, 1758) ha sido desde siempre uno de los animales más valorados por las diversas civilizaciones, pues desde su domesticación (hace aproximadamente unos 5000 años en las estepas occidentales de Eurasia) (Valdez, 2013) ha sido admirado por su belleza y elegancia, y se ha empleado para numerosas actividades que abarcan desde la guerra y el transporte de mercancías, hasta el recreo y el deporte.

El reconocimiento nacional e internacional de nuestros equinos, por su calidad genética y funcional, ha favorecido el crecimiento de un sector productor de los más arraigados hoy en día en nuestro país. Sin embargo, la compra-venta de estos équidos se ha visto afectada en los últimos años por la grave crisis económica que sufrimos. A pesar de ello, este sector no ha dejado de tener gran importancia en España (Junta de Extremadura, 2016).

El censo caballar en España a día de 01 de marzo de 2018 ascendía a 632355 caballos, siendo Extremadura, la región que ocupaba el cuarto lugar, con 40569 cabezas de equinos censados (Lueso, 2018). Cabe destacar que, dentro de los caballos de pura raza, el que predomina en nuestra cabaña equina pertenece a la raza más emblemática de nuestro país, que es el Pura Raza Española (PRE) (Junta de Extremadura, 2016).

El comercio nacional e internacional de equinos es una actividad económica relevante. En 2017, España exportó más de 6000 caballos, aunque en los últimos años las exportaciones han disminuido notablemente (Lueso, 2018). Por ello, es conveniente vigilar los aspectos relacionados con la sanidad de estos animales que traspasan tanto límites regionales como fronteras internacionales. No en vano, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) determina la necesaria vigilancia de ciertas enfermedades para evitar su propagación internacional. El montante de pérdidas que generan dichas enfermedades es muy importante, por lo que se deben tomar todas las medidas necesarias que conduzcan a disminuir su incidencia. Entre estas enfermedades ocupa un lugar destacado la Piroplamosis Equina (PE), enfermedad anemizante causada por dos hemoparásitos: *Theileria equi* y *Babesia caballi*. Es una enfermedad que afecta a

caballos, burros, mulas y cebras (Soulsby, 1987; Quiroz, 1990). Se encuentra ampliamente distribuida por zonas tropicales, subtropicales y templadas (Chevrier *et al.*, 1979; Friedhoff, 1982; Tenter y Friedhoff, 1986), por lo que también está presente en nuestro país, donde la situación epidemiológica se puede considerar como endémica (Habela *et al.*, 2005b). Esta parasitosis es transmitida a través de vectores, las garrapatas duras o ixódidos (Cattcott y Smithcors, 1972), siendo los géneros *Hyalomma*, *Rhipicephalus* y *Dermacentor* (Brüning, 1996; Friedhoff, 1988; de Waal, 1992; Uilenberg, 1995; Mehlhorn y Schein, 1998; Battsetseg *et al.*, 2001; Massaro *et al.*, 2003; OIE, 2014) los que se cree que potencialmente participan en el contagio de dicha enfermedad. Todos estos géneros se encuentran presentes de forma más o menos abundante en España, incluida Extremadura (Habela *et al.*, 2005b).

Esta protozoosis genera gran cantidad de pérdidas económicas en nuestra comunidad, en nuestro país y en general en todos los países donde la enfermedad es endémica (Friedhoff *et al.*, 1990; Brüning *et al.*, 1997; Asgarali *et al.*, 2007; Acici *et al.*, 2008; Hunfeld *et al.*, 2008). Entre otras razones, estas pérdidas se derivan de las limitaciones o restricciones que lógicamente aplican ciertos países a la admisión de los animales positivos, países como por ejemplo Argentina, Australia, Brasil, Canadá, Chile, EEUU, Japón, etc. (Jongejan y Uilenberg, 2004), que exigen en sus reglamentaciones sanitarias la negatividad a las pruebas serológicas (Brüning, 1996; Schein, 1988; Tenter y Friedhoff, 1986). En este sentido, y como ya hemos referido anteriormente, hay que destacar que tanto España como Portugal se sitúan en una zona endémica de enfermedad, lo cual limita la exportación del "Pura Raza Español" y del caballo "Lusitano", razas de reconocido prestigio internacional. Estas pérdidas también se producen por las muertes ocasionadas tanto en potros como en adultos y por la pérdida de funcionalidad derivadas de las secuelas originadas. En determinados casos se puede llegar a alcanzar una mortalidad de hasta el 50% (de Waal, 1992). Conviene cuantificar los gastos originados por el tratamiento de los animales afectados y de la prevención de la infestación por garrapatas. Es por ello, que la comunidad científica apoya firmemente la necesidad de evitar la propagación a otros países de las diferentes especies de ixódidos potencialmente implicadas como vectores de esta enfermedad (Knowles, 1996). Hay que considerar también las mermas económicas debidas a la existencia de la transmisión transplacentaria en el caso de infección por *T. equi* (Erbsiöh, 1975; Phipps y Otter, 2004; Georges *et al.*, 2011; Chhabra *et al.*, 2012), que

puede provocar abortos, nacimientos prematuros o nacimiento de potros portadores asintomáticos (Potgieter *et al.*, 1992; Phipps y Otter, 2004; Allspp *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008).

Cabe destacar, que el diagnóstico de esta hemoparasitosis no es totalmente efectivo a día de hoy. Son muchas las técnicas diagnósticas que se han empleado y emplean para la detección de los caballos infectados. Estos métodos, que son tanto directos como indirectos, muestran una sensibilidad y especificidad muy dispar, pudiendo aparecer falsos negativos y falsos positivos. Muchos de estos errores son consecuencia de las reacciones cruzadas que suelen presentarse. Todo ello es de vital importancia de cara a la exportación de los animales, pues diferentes autores están demostrando que algunos caballos importados a sus países son portadores de *T. equi* y *B. caballi* (Sigg *et al.*, 2010; Baptista *et al.*, 2013; Ayala-Valdovinos *et al.*, 2014). Las técnicas directas más utilizadas son la visualización microscópica de frotis sanguíneos teñidos y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en alguna de sus variantes (PCR convencional, PCR anidada, PCR múltiple, etc.). La observación al microscopio de los frotis sanguíneos ayuda principalmente en el diagnóstico de animales en fase aguda de la enfermedad. La PCR puede emplearse en todas las fases de la enfermedad. También se emplean los métodos indirectos serológicos para la detección de anticuerpos específicos frente a *T. equi* y *B. caballi*, como la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), destacando la ELISA competitiva (cELISA) entre estas últimas. La metodología serológica es de elección para el diagnóstico de los caballos portadores crónicos (de Waal, 2012; Chantal *et al.*, 2013; Wise *et al.*, 2013; Mans *et al.*, 2015). Algunos autores destacan la necesidad de combinar varias de estas técnicas, para realizar un diagnóstico más efectivo (Wise *et al.*, 2013).

Un problema añadido es el referido al tratamiento. Hay que destacar que son pocos los principios activos que se encuentran disponibles en el mercado para combatir esta enfermedad. Ninguno de ellos permite la eliminación total (esterilización) de *T. equi* del animal portador. El único principio activo que puede llegar a ser eficaz contra este parásito son las naftoquinonas, entre ellas la buparvacuona (Butalex®). Sin embargo, la comercialización de este medicamento no está permitida en la Unión Europea. Las infecciones causadas por *B. caballi* pueden ser tratadas con el

dipropionato de imidocarb (Imizol<sup>®</sup>), siendo por ahora el principio activo más efectivo (Brüning, 1996; de Waal, 1992).

La lucha y control frente a las garrapatas es una de las posibilidades para prevenir la enfermedad (Brüning, 1996; de Waal, 1992). Para ello, se utilizan acaricidas con objeto de reducir los riesgos de infestaciones en las épocas de mayor exposición. El mayor problema que se presenta en el control de las garrapatas es la aparición de resistencias frente a los acaricidas, teniendo en cuenta, además, que el mantener animales libres de parásitos en muchos casos resulta muy difícil, por no decir, inviable. También podría optarse por el empleo de vacunas frente a garrapatas (que ya se aplican en bovinos), pero a día de hoy no existe ninguna para équidos. Otra de las mejores soluciones sería el desarrollo de una vacuna efectiva frente los piroplásmidos equinos, posibilidad que se viene investigando desde hace tiempo con objeto de lograr este fin (Brüning, 1996; Kumar *et al.*, 2002). En la actualidad sólo se han comercializado vacunas frente a Babesiosis en perros y ninguna para équidos (Rothschild, 2013; Wise *et al.*, 2013; OIE, 2014).

## 1.2.- Justificación y objetivos

Como ya indicábamos anteriormente, hoy en día no existe una técnica eficaz para el diagnóstico de la PE. En España los métodos serológicos como la Inmunofluorescencia Indirecta y la técnica cELISA son los más empleados, además de ser los recomendados por la OIE (OIE, 2014) para la detección de anticuerpos frente a *T. equi* y *B. caballi*. Con respecto a la PCR, podemos decir que es una técnica prometedora para el diagnóstico de PE, aunque poco usada en el territorio español. La PCR permite la detección de animales enfermos tanto en la fase aguda como en la fase crónica, incluso con baja parasitemia (Bashiruddin *et al.*, 1999; Nicolaiewsky *et al.*, 2001; Rampersad *et al.*, 2003; Alhassan *et al.*, 2005; Alhassan *et al.*, 2007b; Bhoora *et al.*, 2010a). La investigación sobre las diferentes variantes de la PCR, o incluso su combinación, parece ser una solución al problema de la falta de una técnica realmente efectiva y satisfactoria.

No son muy numerosos los estudios realizados sobre la prevalencia de esta parasitosis en España, por lo que no existen muchos datos actuales a nivel nacional. Cabe reseñar las investigaciones realizadas por la Unidad de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, que lleva años realizando análisis serológicos basados en la IFI en la región extremeña y el resto del territorio nacional (Habela *et al.*, 1989, 1995, 1998a, 2005a). También algunos otros estudios autonómicos (Camacho *et al.*, 2005; García-Bocanegra *et al.*, 2013) e incluso los desarrollados por ciertos laboratorios en el ámbito del diagnóstico previo a la exportación (Camino *et al.*, 2016). Ello revela la escasa información disponible hasta el momento referida a nuestro país.

Hemos corroborado la existencia de problemas debido a las discrepancias que los autores consultados muestran con respecto a la sensibilidad y especificidad entre técnicas diagnósticas, y por ello, nos propusimos desarrollar una nueva herramienta diagnóstica que mejorase las disponibles en la actualidad.

Por todo ello, se justifican los trabajos realizados en esta tesis doctoral, ya que permitirán la mejora en diferentes aspectos diagnósticos y por extensión, ampliar las

posibilidades de control sobre esta enfermedad parasitaria ampliamente extendida en España.

Así, el objetivo general de esta investigación ha sido desarrollar una técnica diagnóstica útil, fiable y precisa, que permitirá no sólo la detección de équidos que se encuentren en una fase aguda de la enfermedad, sino también de aquellos aparentemente sanos pero que son considerados portadores inaparentes o crónicos. El hecho de poder detectar los animales infectados en cualquiera de sus fases de forma fehaciente, podría evitar el recelo de los compradores tanto nacionales como internacionales, favoreciendo la reactivación del mercado de équidos.

Paralelamente, se comparó la eficacia de diferentes técnicas diagnósticas empleadas (serológicas y moleculares) para determinar cual de ellas era más efectiva en la detección de esta enfermedad en nuestro país, hecho muy importante para contribuir a evitar la difusión de la PE, dentro y fuera de nuestras fronteras, como decíamos anteriormente.

Todas las consideraciones anteriormente expuestas se concretan en los objetivos específicos de esta tesis, que se detallan a continuación:

1.- Contribuir al conocimiento sobre la variabilidad genética de distintas cepas de *B. caballi* de procedencia española, mediante el empleo y la secuenciación molecular de los genes de la  $\beta$ -*tubulina* y el *RAP-1*.

2.- Realizar un estudio epidemiológico para determinar la prevalencia de la Piroplasmosis Equina en el centro y sur de la Península Ibérica mediante el análisis serológico por la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

3.- Comparar las dos técnicas de diagnóstico serológicos tradicionales, IFI y cELISA, determinando el grado de concordancia entre ambas.

4.- Desarrollar y estandarizar una técnica de diagnóstico molecular eficaz y viable que permita detectar los hemoprotozoos causantes de la PE: *T. equi* y *B. caballi*. Este procedimiento estará basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR),

empleando para ello y de manera simultánea diferentes genes (PCR múltiple), combinándola con la PCR anidada, creando así una PCR múltiple anidada (mn-PCR), más eficaz en teoría que ambos métodos por separado.

5.- Efectuar un estudio comparativo entre la técnica molecular mn-PCR con una inmunológica convencional: eELISA.

Cada uno de estos objetivos se alcanzó de forma particular en los trabajos desarrollados y expuestos en el compendio de publicaciones científicas que componen esta tesis doctoral. Así, el primer objetivo fue conseguido en dos de los estudios que a continuación detallamos: «**Genetic variation of the  $\beta$ -tubulin gene of *Babesia caballi* strains**» y «**A multinested-PCR for detection of equine piroplasmids *Babesia caballi* and *Theileria equi***».

Los objetivos 2 y 3 se consiguieron con el estudio realizado en el artículo científico titulado: «**Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Spain**».

Los dos últimos objetivos (4 y 5) se alcanzaron en la publicación titulada: «**A multinested-PCR for detection of equine piroplasmids *Babesia caballi* and *Theileria equi***».



## **2.- Revisión bibliográfica**

---



## 2.1.- Antecedentes

Posiblemente, la primera mención a la PE fuera realizada por Wiltshire en 1883, cuando la denominó “antrax fever”. En el mismo año (1883), Hutcheon designó a este trastorno como “fiebre biliar”, discrepando con Wiltshire en cuanto a su origen. En 1888, Dupuy describió esta afección como “malaria equina” en el oeste de África. Posteriormente, en 1894, diferentes autores, entre los que destacamos a Nunn y Rutherford, denominaron esta enfermedad como la “forma biliar de la peste equina”. Guglielmi (1899) fue el primer autor que detectó el protozoo en la sangre de los équidos. En 1902, Rickmann estudió esta enfermedad también en el continente africano, indicando que dicho hemoparásito era el agente causal de la “peste equina”. Pero sería Theiler (1901, 1902) el primer investigador que discriminase entre la “fiebre biliar” y la “peste equina”, pese a que un mismo individuo pudiera padecer ambas afecciones simultáneamente (DAFF, 2016).

En 1901, Theiler envió unas extensiones sanguíneas de caballos que supuestamente padecían “fiebre biliar” a Laveran, para que éste determinara el agente causal que estaba provocando realmente la enfermedad. Laveran identificó a estos parásitos como piroplásmidos, incluyéndolos dentro del género *Piroplasma*, nombrándolos como *Piroplasma equi* (Laveran, 1901). Más tarde, Koch (1904) diferenciaría, gracias a la morfología, las dos formas parasitarias que causaban la PE, considerando que eran agentes causales de procesos diferentes (DAFF, 2016).

Posteriormente, Nuttal y Strickland (1910, 1912) demostraron que la PE era causada por dos parásitos intracelulares diferentes, los cuales fueron clasificados en dos géneros distintos. Los parásitos detectados y descritos por Theiler y Laveran (1901), fueron incluidos por Franca (1909) en el género *Nuttalia* (citado por Wenyon, 1926) (DAFF, 2016), que poco más tarde se reclasificaría taxonómicamente como *Babesia equi*, aunque el nombre de *Nuttalia equi* se seguiría empleando hasta los años '40 (Scoles y Ueti, 2015). En 1998, *B. equi* pasaría a formar parte del género *Theileria* (Mehlhorn y Strickland, 1998) en base a sus características morfológicas, biológicas, isoenzimáticas y moleculares, así como por su resistencia a babesicidas y sensibilidad a fármacos con poder theilericida (Scoles y Ueti, 2015).

Como indicaron Scoles y Ueti (2015), otros parásitos morfológicamente más alargados, y en un principio denominados *Piroplasma caballi*, se incluyeron en el

género *Babesia* (Nuttal y Strickland, 1912), manteniéndose desde entonces en dicho género y denominándose como *Babesia caballi*.

Desde su descripción, ambos parásitos han sido detectados en la mayoría de los países de los continentes africano, americano, asiático y europeo (Tenter, 1986; Tenter *et al.*, 1988; Friedhoff *et al.*, 1990; de Waal, 1992; Barbosa, 1995; Xuan *et al.*, 2002; Akkan *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003; Boldbaatar *et al.*, 2005; Salim *et al.*, 2008; Sevinc *et al.*, 2008; Kerber *et al.*, 2009; Jaffer *et al.*, 2010; Kouam *et al.*, 2010a; Moretti *et al.*, 2010; Mujica *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2013a; Ros-García *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2013; Guidi *et al.*, 2015; Posada-Guzmán *et al.*, 2015; Mahmoud *et al.*, 2016; Sumbria *et al.*, 2016b).

Como ya apuntó Sevilla (2005), el primer caso descrito en España de theileriosis se detectó en una yegua de la provincia de Badajoz en 1934, hallazgo realizado por Almarza Herranz. Posteriormente, en 1941 y en 1943, Bueso Gómez vuelve a diagnosticar en la misma provincia otros dos casos de theileriosis en caballos. Este mismo autor, hasta 1944, comunicó haber tratado otros cinco casos de infección por *B. caballi*, como se reflejó en un artículo de revisión sobre esta hemoparasitosis escrito por Cordero del Campillo *et al.* (1974). Durante esta década y hasta los años ochenta, muchos son los casos de PE que se denunciarían en las provincias extremeñas de Badajoz y Cáceres, y también en Ciudad Real y Toledo (Castilla la Mancha), Córdoba (Andalucía), León (Castilla y León), así como en Navarra. Estos datos se reflejaron en el Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos de 1980 (Cordero del Campillo *et al.*, 1980). Más tarde se describen otros casos en la provincia de Granada (Romero y García, 1981). Desde entonces y hasta nuestros días no han dejado de notificarse casos producidos por ambos hemoparásitos, no sólo en la geografía española (Habela *et al.*, 1989, 1995, 1998a, 2005a; Camacho *et al.*, 2005; Vega y Domingo, 2012; García-Bocanegra *et al.*, 2013; Camino *et al.*, 2016) sino en prácticamente todos los países del mundo, como ya hemos comentado.

## 2.2.- Sistemática

La taxonomía y clasificación de estos parásitos es confusa y está permanentemente sometida a debate.

Según Votýpka (2011), varios géneros han sido descritos históricamente como piroplásmidos: *Theileria* y *Rangelia* pertenecientes a la familia Theileriidae, que se caracterizaban por poseer esquizogonias preeritrocíticas en los linfocitos, y los géneros *Babesia* o *Piroplasma*, *Nicolliia*, *Nuttallia*, *Smithia*, *Rossiela* y *Gonderia* perteneciente a la familia Babesiidae que diferían morfológicamente en el aspecto de su forma intraeritrocitaria. Además, otros géneros se describieron como integrantes de este grupo: *Microbabesia* o *Babesiella*, *Achromaticus* y *Cytotauxzoon*. Posteriormente, la clasificación de los piroplásmidos se redujo sólo a dos familias, por un lado, la familia Theileriidae (du Toit, 1918) que comprende únicamente el género *Theileria* (Bettencourt, Franca y Borges, 1907) y que consta de unas 40 especies y, por otro lado, la familia Babesiidae (Poche, 1913), que contiene el género *Babesia* (Starcovici, 1893) con más de 110 especies. Las diferencias que determinaron la separación entre ambas familias, fueron las siguientes: la ausencia de un ciclo preeritrocitario en el caso de *Babesia* y la ausencia de una transmisión transovárica en *Theileria* (Homer *et al.*, 2000).

Los dos agentes causales de la PE son integrantes del Infraphylum Apicomplexa que se replican en el interior de las células sanguíneas. La denominación “apicomplexa” deriva de la posesión de un complejo apical que permite al protozoo invadir la célula a parasitar. Estos parásitos denominados durante mucho tiempo esporozoos, se encuentran incluidos hoy día dentro de los alveolados (Superphylum Alveolata), por la presencia de alveolos corticales en su célula (OCW, 2018). Estas estructuras vesiculares se encuentran situadas debajo de la membrana citoplasmática del parásito (Boenigk *et al.*, 2015; OCW, 2018).

Nos vamos a centrar en primer lugar en *B. caballi*, para después describir las peculiaridades de *T. equi*.

### **2.2.1.- Taxonomía de *Babesia caballi***

Tradicionalmente, las babesias se han agrupado en dos grupos de acuerdo a su tamaño. En un primer grupo se encuentran las babesias pequeñas, cuyos merozoítos miden 1-2,5  $\mu\text{m}$ , entre las que encontramos a *B. microti* y a *B. gibsoni*. El otro grupo está conformado por las llamadas babesias grandes como *Babesia caballi* y *Babesia canis*, con merozoítos que miden entre 2,5-5  $\mu\text{m}$  (Homer *et al.*, 2000; OCW, 2018).

La clasificación taxonómica se ha basado en características morfológicas, morfométricas, biológicas, antigénicas, inmunoenzimáticas, así como en los resultados de estudios moleculares de ADN. A continuación, mostramos la clasificación taxonómica propuesta por Ruggiero *et al.* (2015).

Superreino **Eukaryota** (Chatton, 1925)

Reino **Chromista** (Cavalier-Smith, 1981)

Subreino **Harosa** (Cavalier-Smith, 2010)

Infrarreino **Halvaria** (Cavalier-Smith, 2010)

Superphylum **Alveolata** (Cavalier-Smith, 1991)

Phylum **Miozoa** (Cavalier-Smith, 1987)

Subphylum **Myzozoa** (Cavalier-Smith y Chao, 2004)

Infraphylum **Apicomplexa** (Levine, 1970)

Superclase **Sporozoa** (Leuckart, 1879)

Clase **Coccidiomorpha** (Doflein, 1901)

Subclase **Hematozoa** (Vivier, 1982)

Superorden **Aconoidia** (Cavalier-Smith, 2014)

Orden **Piroplasmida** (Wenyon, 1926)

Familia **Babesidae** (Poche, 1913)

Género ***Babesia*** (Starcovici, 1893)

Especie ***Babesia caballi*** (Nuttall y Strickland, 1919)

### **2.2.2.- Filogenia de *Babesia caballi***

En el caso de *B. caballi*, se han ido descubriendo nuevas cepas a lo largo del tiempo. La filogenia de estos parásitos no es más que una forma de establecer las relaciones ancestro-descendiente en un escenario que abarca cualquier nivel taxonómico, siempre con el matiz que aporte el gen que se esté analizando (Tamura *et al.*, 2013).

Uno de los genes más empleados en los estudios filogenéticos y apropiado para este fin según algunos autores (Ellis *et al.*, 1992), es el gen ***18S rRNA***, sobre el que

hablaremos a continuación. Es uno de los genes más conocidos, habiendo sido usado desde hace tiempo para análisis filogenéticos tanto de Babesias como de Theilerias.

A finales del siglo XX, sólo se tenían datos moleculares de ADN en el GenBank (base de datos de secuencias genéticas del NCBI) de una secuencia del gen *18S rRNA* de una cepa de *B. caballi* procedente de Sudáfrica, empleada en los estudios filogenéticos. Con esta secuencia se determinó que este parásito se encontraba en un grupo junto con otras babesias de gran tamaño como *B. bigemina* y *B. canis*, y cerca de *Babesia bovis* (Allsopp *et al.*, 1994).

En 2004, Criado-Fornelio *et al.*, tras la secuenciación de ciertas cepas de dicho gen, determinaron que había tres genotipos de *B. caballi* diferentes en España. El genotipo *B. caballi* Spain 2 era igual al descubierto en Sudáfrica, mientras que los denominados como *B. caballi* Spain 1 y *B. caballi* Spain 3 eran diferentes (presentaban una homología con el genotipo de Sudáfrica del 97% y 99%, respectivamente). El árbol filogenético que obtuvieron (que incluía las pocas secuencias que se conocían tanto de Babesias como de Theilerias) demostraba que las Babesias se encontraban en un grupo totalmente diferenciado de las Theilerias.

Nagore *et al.* (2004) establecieron la existencia de dos genotipos distintos de *B. caballi* en España. Uno de ellos era muy similar al procedente de Sudáfrica, el otro era un genotipo diferente, al que denominaron *B. caballi*-like, y que presentaba un 97,4% de identidad genética con la secuencia sudafricana. El árbol filogenético que obtuvieron a partir de las secuencias de Babesia y Theileria no difería del de Criado-Fornelio *et al.* (2004), que mostraba dos grupos, uno que incluía Babesias y el otro Theilerias.

Más tarde, Bhoora *et al.* (2009) describieron la existencia de seis secuencias nuevas de *B. caballi* en Sudáfrica. El análisis filogenético que realizaron con las variantes de *B. caballi*, las separaba en dos grupos. El primero (A) incluía dos secuencias españolas (Criado-Fornelio *et al.*, 2004; Nagore *et al.*, 2004) junto con una cepa de Estados Unidos (Kappmeyer *et al.*, 1999). El segundo grupo (B) estaba formado por dos subgrupos (B1 y B2), en los que se encontraban cepas obtenidas exclusivamente en Sudáfrica (incluida la primera cepa conocida de *B. caballi*).

Un año después, Bhoora *et al.* (2010b), tras secuenciar el gen *18S rRNA* de algunas cepas de sus cultivos *in vitro* y añadirlas a su cladograma, confirmaron la existencia de los clados establecidos en su estudio anterior (Bhoora *et al.*, 2009).

Posteriormente, Munkhjargal *et al.* (2013), al aportar nuevas secuencias de *B. caballi* procedentes de Mongolia, establecieron la existencia de tres genotipos dentro de

esta especie (A, B y C). El A incluía secuencias de Mongolia, una de Sudáfrica y una española (Nagore *et al.*, 2004). En el B se situaban la mayoría de las cepas sudafricanas y el C estaba constituido básicamente de variantes originarias de Mongolia, el cual mostraba cierta diversidad (96,5-100% de identidad entre las secuencias).

Qablan *et al.* (2013), también aceptaron la existencia de tres genotipos de *B. caballi*, pues así lo mostraba su análisis filogenético. Ellos incluyeron diferentes secuencias obtenidas en Jordania, que resultaron estar distribuidas en los tres genotipos. En el genotipo A se situaban, además, secuencias de origen español. En el B y en el C, también se incluían secuencias procedentes de Sudáfrica. Los grupos A y B ya habían sido establecidos por Bhoora *et al.* (2009).

Los primeros autores que aportaron cierto conocimiento sobre el gen *RAP-1* (gen que codifica la proteína 1 asociada a la roptria), sinónimo del gen *BC48*, fueron Kappmeyer *et al.* (1999) e Ikadai *et al.* (1999), quienes emplearon cepas de origen americano para el desarrollo de la técnica cELISA y ELISA, respectivamente. Mucho más tarde, estudios de Bhoora *et al.* (2010b) contribuyeron con una serie de secuencias obtenidas de *B. caballi* procedentes de Sudáfrica. Estos autores realizaron un estudio filogenético con todas las secuencias hasta el momento conocidas, dando a entender que había dos grupos principales de *B. caballi* (A y B). El grupo A incluía las secuencias previamente descubiertas (origen americano) y el B las secuencias de Sudáfrica, que a su vez se subdividía en los subgrupos B1 y B2.

Munkhjargal *et al.* (2013) en su estudio filogenético (que incluía cepas procedentes de Mongolia y de otros países), determinaron que había 4 genotipos. En el 1 estarían situadas las secuencias de Sudáfrica, en el 2 una secuencia de Mongolia y en el 3 una variante procedente de Brasil. El genotipo 4 estaría conformado por secuencias procedentes de Mongolia y una de EEUU.

Rapoport *et al.* (2014) estudiaron el gen *RAP-1* en muestras tomadas en Israel, obteniendo 5 secuencias más de este gen y llegando a la conclusión de que las muestras de Israel estaban en el mismo clado que las sudafricanas (clado A), subdividido a su vez en dos subgrupos (A1 y A2) y separadas de las secuencias procedentes de América (clado B). Las secuencias de Israel y las americano-caribeñas mostraban un grado de identidad genética entre sí del 81-82%.

Díaz-Sánchez *et al.* (2018) obtuvieron la misma filogenia que Munkhjargal *et al.* (2013). Las secuencias que aportaron de Cuba se agruparon con las del genotipo 3.

El cladograma obtenido por Nugraha *et al.* (2018), también mostraba la existencia de 4 clados, pero en el clado 1 se situaban secuencias de Filipinas, EEUU, Mongolia, Egipto y Puerto Rico. El clado 2 agrupaba secuencias de Indonesia. El 3 incluía una cepa de Israel y, el clado 4, dos secuencias: una de Israel y otra de Sudáfrica.

Si nos centramos en el gen mitocondrial del citocromo B (*cytB*), nos encontramos con que la información disponible en bases de datos genéticas públicas es muy limitada en relación a la especie *B. caballi*, con dos secuencias publicadas en el GenBank, una en 2016 (Hikosaka *et al.*, 2010) y la otra en 2018 (Dahmana *et al.*, unpublished). Tian *et al.* (2013) apuntaron que estudios basados en este gen nos ayudarían a reconocer linajes cercanos entre diferentes especies de Babesias, por lo que su estudio puede considerarse interesante. Tampoco hemos localizado estudios filogenéticos con respecto al gen de la  *$\beta$ -tubulina*, pues apenas hay información genética sobre las diferentes cepas de *B. caballi*.

### 2.2.3.- Taxonomía de *Theileria equi*

La información disponible relativa a la taxonomía de *T. equi*, es muy abundante y en ocasiones contradictoria. La clasificación se ha basado en las mismas características que ya nombrábamos en el caso de *B. caballi*. A continuación, se muestra la clasificación taxonómica de *T. equi* propuesta por Ruggiero *et al.* (2015).

Superreino **Eukaryota** (Chatton, 1925)

Reino **Chromista** (Cavalier-Smith, 1981)

Subreino **Harosa** (Cavalier-Smith, 2010)

Infrarreino **Halvaria** (Cavalier-Smith, 2010)

Superphylum **Alveolata** (Cavalier-Smith, 1911)

Phylum **Miozoa** (Cavalier-Smith, 1987)

Subphylum **Myzozoa** (Cavalier-Smith y Chao, 2004)

Infraphylum **Apicomplexa** (Levine, 1970)

Superclase **Sporozoa** (Leuckart, 1879)

Clase **Coccidiomorpha** (Doflein, 1901)

Subclase **Hematozoa** (Vivier, 1982)

Superorden **Aconoidia** (Cavalier-Smith, 2014)

Orden **Piroplasmida** (Wenyon, 1926)

Familia **Theileriidae** (du Toit, 1918)

Género ***Theileria*** (Bettencourt *et al.*, 1907)

Especie ***Theileria equi*** (antes *B. equi*) (Levine, 1901) (Mehlhorn y Schein, 1998)

#### 2.2.4.- Filogenia de *Theileria equi*

Dolan (1989) nos describía la situación del género *Theileria* como una verdadera confusión de sinónimos, homónimos y subespecies. Para este autor, la única forma de resolver dicho escenario sería el desarrollo de diferentes técnicas inmunológicas, bioquímicas y de biología molecular que permitieran la discriminación entre diferentes especies. Actualmente, la situación ha mejorado gracias el desarrollo de las técnicas de biología molecular y particularmente, la secuenciación, aunque sin llegar a un esclarecimiento total de la filogenia en esta especie.

Muchos son los sinónimos con los que se ha conocido a *T. equi*: *Piroplasma equi*, *Nuttalia equi*, *Nuttalia asini*, *Nuttalia minor*, *Nicollia equi* y *Babesia equi*, como indicaban Mehlhorn y Schein (1998). Varias fueron las razones que se esgrimieron para cambiar de género a la conocida como *B. equi*, entre ellos se encontraba el hecho de que se desarrolla en los glóbulos blancos previo a su ciclo eritrocitario y que muestra transmisión transestadial (Brüning, 1996). Razones entre otras, que llevarían a Mehlhorn y Schein (1998) a incluir a *B. equi* en el género *Theileria*. Desde entonces, numerosos investigadores han tratado de dilucidar la filogenia de este género y en concreto de esta especie, como veremos en este apartado.

Los estudios filogenéticos se han basado en los datos obtenidos por secuenciación del ADN. De nuevo, el gen más utilizado para dicha finalidad es el *18S rRNA*. Son menos frecuentes los estudios sobre el gen *EMA-1* y el *EMA-2*.

El gen *18S rRNA* está situado en el cromosoma 1, de los cuatro cromosomas que posee este parásito (Kappmeyer *et al.*, 2012). Este gen se ha considerado como una de las herramientas más útiles en la identificación de diferentes especies de piroplásmidos (Allsopp *et al.*, 1993; Katzer *et al.*, 1998; Allsopp y Allsopp, 2006), aunque la variación del gen *18S rRNA* por sí sola, no debería ser el único dato que sustentase la adscripción a una especie (Chae *et al.*, 1998). También se ha empleado para la identificación de diferentes genotipos o cepas procedentes de distintas regiones geográficas (Chae *et al.*, 1998; Criado-Fornelio *et al.*, 2004).

Haciendo un recordatorio sobre lo sucedido con la clasificación del parásito que nos compete en este apartado, podemos decir que durante los años noventa del siglo pasado, aún no estaban muy desarrollados los estudios basados en el ADN y pocas eran las secuencias que se conocían sobre los piroplásmidos en general, y en concreto sobre

*T. equi*. Autores como Allsopp *et al.* (1994) y Katzer *et al.* (1998), basándose en información obtenida de las secuencias del gen *18S rRNA*, indicaron que la entonces denominada *B. equi*, era un piroplásmido, aunque aún no había sido establecida una relación tan estrecha entre este parásito y los organismos clasificados tradicionalmente en el género *Theileria*. Allsopp *et al.* (1994) concluyeron que este hemoparásito estaba filogenéticamente más cerca de otros géneros como *Cytauxzoon* que de *Babesia*. Esta sería una de las primeras aportaciones a la idea de que esta especie podría situarse en un grupo parafilético a las Babesias, pudiendo ser dicho grupo (el que incluía a *B. equi*) el ancestro del resto de Theilerias. Esta misma idea sería apoyada posteriormente por los resultados de los estudios de Criado-Fornelio *et al.* (2003b).

Penzhorn *et al.* (2001) establecieron una filogenia de los piroplásmidos formada por 4 grupos o clados, situándose las Babesias verdaderas (con transmisión transovárica), en el grupo 1 y *B. equi* (*T. equi*) en el grupo 2, denominado como grupo de las “Theilerias clásicas”.

Criado-Fornelio *et al.* (2003a), amplificaron primero y secuenciaron posteriormente, fragmentos de dos nuevos genotipos de *T. equi* en España, a los que denominaron aún con el nombre de *Babesia*: *B. equi* Spain 1 y *B. equi* Spain 2 (con un 99% de identidad con una secuencia procedente de Sudáfrica). Más tarde, publicaron un árbol filogenético con 5 grupos de piroplásmidos, en lugar de los 4 propuestos por Penzhorn *et al.* (2001). La principal diferencia era que el grupo de las verdaderas Babesias (Penzhorn *et al.*, 2001) se dividía en dos subgrupos. Aunque *B. equi* (*T. equi*) se mantenía ubicada en el grupo de “Theilerias clásicas” y *B. caballus* se hallaría en el grupo de las babesias de ungulados, junto con *B. bovis*, *B. ovis* y *B. bigemina*. Estos investigadores también indicaron, que la secuencia de *B. equi* procedente de Sudáfrica presentaba ciertas diferencias con las cepas españolas, pudiendo ser la cepa africana un ancestro de las españolas (Criado-Fornelio *et al.*, 2003b). Después, Criado-Fornelio *et al.* (2004), secuenciaron por completo el gen *18S rRNA* de las cepas españolas, mostrando que ambas tenían una homología del 99% con la procedente de Sudáfrica.

Nagore *et al.* (2004) demostraron, mediante la secuenciación de una serie de productos amplificados por PCR, que existía otro genotipo diferente de *T. equi* en España, al que denominaron como *T. equi*-like, cuya identidad era del 96,8% con los genotipos *B. equi* Spain1 y Spain2 (Criado-Fornelio *et al.*, 2003a). Como decíamos anteriormente, los estudios filogenéticos realizados por Nagore *et al.* (2004),

determinaron que había dos grupos muy bien diferenciados dentro de los piroplásmidos, el que incluía a las Babesias y el que incluía a las Theilerias.

En 2006, Criado-Fornelio *et al.*, constataron que la cepa *T. equi*-like del sur de España (a la que denominaron como *T. equi* Spain 3) tenía menos similitudes genéticas con la *T. equi*-like procedente del norte de país (secuenciada por Nagore *et al.*, 2004), que con una cepa aislada en garrapatas de Suiza. La presencia de esta cepa (*T. equi* Spain 3) ha sido posteriormente descrita en otras partes de España, en concreto en la zona de Burgos (Giménez *et al.*, 2009).

Bhoora *et al.* (2009) amplificaron ADN de diferentes cepas de *T. equi*, y tras su posterior secuenciación, indicaron la existencia en Sudáfrica de 12 nuevas secuencias. El árbol filogenético que elaboraron, mostraba que las secuencias de *T. equi* se distribuían en tres grupos diferentes (A, B y C). El grupo A, incluía la primera cepa sudafricana secuenciada, una de EEUU y los genotipos descubiertos por Criado-Fornelio *et al.* (2003a). En el segundo grupo (B) había algunas cepas de *T. equi* que afectaban a cebras y la cepa *T. equi*-like descubierta por Nagore *et al.* (2004). En el grupo C se situaban algunas secuencias exclusivas de Sudáfrica. Además, se observaba que las Theilerias de caballo estaban claramente diferenciadas, formando un clado y, por tanto, separadas del resto de especies de este género.

Los estudios filogenéticos realizados por Salim *et al.* (2010), tras secuenciar fragmentos del gen *18S rRNA* de diferentes cepas procedentes de Sudán, sugerían que había cuatro grupos (A, B, C y D) perfectamente diferenciados. Los tres primeros coincidían con los descritos por Bhoora *et al.* (2009), pero en el cuarto (grupo D) se encontraban la mayoría de las cepas secuenciadas por Salim *et al.* (2010). Igualmente, Hall *et al.* (2013) examinaron 36 muestras procedentes de diferentes estados de EEUU, obteniendo el ADN necesario para secuenciar dichas muestras y determinaron que había 4 grupos filogenéticos. En el grupo A estarían la mayoría de las secuencias americanas, algunas procedentes de África (Bhoora *et al.*, 2009) y otras dos (*B. equi* Spain 1 y 2 y *B. equi* dog) procedentes de España (Criado-Fornelio *et al.*, 2003a). En el grupo B estarían situadas una cepa de Sudán, dos de Corea y dos españolas (*T. equi*-like y *B. equi* Spain 3). En el grupo C se encontrarían ciertas variantes de África y Méjico, y en el grupo D, secuencias procedentes de Sudán.

Tras la inclusión de ciertas secuencias de *T. equi* procedentes de Mongolia, los trabajos de Munkhjargal *et al.* (2013) mostraron una filogenia formada por 5 genotipos (A, B, C, D y E). Las secuencias de este país estaban situadas en los genotipos A y E.

En el A ya estaban incluidas las secuencias españolas y una sudafricana (Criado-Fornelio *et al.*, 2003a; Bhoora *et al.*, 2009). En el genotipo E, se agrupaban ciertas secuencias de Mongolia, Corea e incluso alguna española (Nagore *et al.*, 2004).

Por otro lado, Qablan *et al.* (2013), tras secuenciar muestras procedentes de Jordania, llegaron a la misma conclusión que Munkhjargal *et al.* (2013), pues igualmente establecieron cinco clados para *T. equi* (A, B, C, D y E). Las secuencias que habían obtenido Qablan *et al.* (2013) se incluyeron en los clados A, B y D.

Los estudios filogenéticos de Seo *et al.* (2013) también apoyaron la existencia de 5 grupos principales. Las cepas de Corea se incluyeron en lo que sería el genotipo B del árbol filogenético mostrado por Qablan *et al.* (2013). Alanazi *et al.* (2014) secuenciaron algunas cepas de Arabia Saudita. La filogenia que obtuvieron mostró la existencia de cuatro clados (A, B, C y D), clasificando sus secuencias principalmente en el clado A (junto con cepas españolas, sudafricanas y americanas) y en el grupo B, junto a cepas españolas y surcoreanas. El cladograma mostrado por Díaz-Sánchez *et al.* (2018) determinaba la existencia de cinco clados (A, B, C, D y E), donde las cepas de Cuba, que habían secuenciado, estaban agrupadas principalmente con las de EEUU (clado A).

Basándose en la información obtenida gracias al estudio del gen *18S rRNA*, Criado-Fornier *et al.* (2003a) concluyeron que *T. equi* pertenecía a un clado asociado al resto de Theilerias, pero distinto de ellas. Estos resultados se apoyaban en los obtenidos por Allsopp *et al.* (1994), los cuales serían corroborados posteriormente por Allsopp y Allsopp (2006), cuyos análisis filogenéticos indicaron que *T. equi* se encontraría en una posición intermedia entre *Babesia bovis* y el resto de Theilerias. Kappmeyer *et al.* (2013), sugirieron la necesidad de crear un nuevo género muy próximo al género *Theileria*, para incluir a *T. equi*. Siguiendo esta propuesta, en la filogenia de *T. equi* podría haber dos escenarios posibles: en el primero, *T. equi* junto con *T. parva* y *T. annulata* formarían un único género. En el segundo, estas especies conformarían tres géneros separados. Mans *et al.* (2015), sugirieron que los diferentes linajes de *T. equi* constituirían un clado por sí mismos, separados del resto de Theilerias.

El estudio realizado durante los años noventa sobre el gen *EMA-1*, ya indicaba que *B. equi* debería de incluirse en otro género, en concreto en el de las Theilerias, pues estos genes (los pertenecientes a la familia EMA) son comunes a las especies de dicho género (Kappmeyer *et al.*, 1993; Knowles *et al.*, 1997) y no aparecen en las Babesias. El gen *EMA-1* pertenece a una familia que engloba 10 genes distintos (Kappmeyer *et*

*al.*, 2013) y de los cuales hay pocos estudios filogenéticos. Katzer *et al.* (1998) ya hablaban de las secuencias del antígeno mayor de superficie del merozoíto (mMPSA) y establecieron con ellas un árbol filogenético que indicaba que *T. equi* (*B. equi*) tenía menor similitud con el resto de las Theilerias que la que existía entre ellas mismas. Este hecho se confirmó con los datos del gen *18S rRNA*.

Bhoora *et al.* (2010c) secuenciaron el gen *EMA-1* en una serie de muestras procedentes de Sudáfrica. Con dichas secuencias y con las existentes en el NCBI realizaron un árbol filogenético del gen *EMA-1*, donde se observaron tres grupos: A, B y C. En el grupo A se situaban cepas procedentes de Florida, Brasil, Marruecos, Rusia y algunas sudafricanas. En el grupo B, cuatro cepas africanas y la cepa *T. equi* USDA (de EEUU). El último grupo (C) estaba constituido básicamente por cepas de Sudáfrica.

Munkhjargal *et al.* (2013) establecieron, usando las secuencias del *EMA-1* obtenidas de la base de datos del GenBank, y otras de Mongolia secuenciadas por ellos mismos, que había cuatro genotipos de *T. equi*. El genotipo 1 estaba constituido por secuencias de Mongolia, Marruecos, EEUU, Brasil y Rusia. El genotipo 2 estaba integrado por secuencias de África. El 3 agrupaba algunas procedentes de Brasil y EEUU. En el genotipo 4 se reunían secuencias de Mongolia. Posteriormente, Kumar *et al.* (2013) secuenciaron algunas muestras de la India, construyendo un árbol filogenético que concordaba con el de Munkhjargal *et al.* (2013). Las secuencias de Kumar *et al.* (2013), así como la aportada posteriormente en el estudio de Díaz-Sánchez *et al.* (2018), de origen cubano, se agruparon con las del genotipo 1 de la filogenia establecida por Munkhjargal *et al.* (2013).

Conocemos pocas secuencias genéticas del gen *EMA-2*, aún así, Nugraha *et al.* (2018) han aportado una filogenia donde se puede observar la existencia de tres clados. En el clado 1 se incluyeron dos secuencias de EEUU y una de Indonesia. En el clado 2, secuencias de la India y en el 3, se agruparon una secuencia de Brasil y otra de EEUU.

Aún se sigue encontrando variación genética en el gen *18S rRNA* y en el gen *EMA-1*, y como algunos autores están demostrando, existe heterogeneidad genética independientemente de la situación geográfica de las cepas (Manna *et al.*, 2018).

Con respecto al gen *cytB*, podemos indicar que al igual que pasaba con *B. caballi*, encontramos muy poca información genética disponible de *T. equi*, pues sólo hay dos entradas en la base de datos NCBI (Hikosaka *et al.*, 2010; Kappmeyer *et al.*,

2012), por ello, no existe un estudio filogenético de esta especie referida a este gen. Tampoco hemos encontrado cladogramas del gen de la  *$\beta$ -tubulina* de *T. equi* en la bibliografía consultada.

## 2.3.- Ciclo biológico de los piroplásmidos equinos

La Babesiosis o Piroplasmosis es conocida desde hace tiempo y fue Babesia el primer patógeno de vertebrados conocido que fuera transmitido por picadura de artrópodos (Assadian y Stanek, 2002). De hecho, fue Babes en 1888 quien describió por primera vez estos parásitos en bovinos de Rumanía y, posteriormente, en 1892 en ovinos. Smith y Kilborne en 1893, indicaron que la fiebre de Texas (causada por *B. bigemina*) se transmitía a los bovinos a través de la picadura de garrapatas (Hunfeld *et al.*, 2008; Assadian y Stanek, 2002). Los hemoprotozoos que causan la piroplasmosis, también denominados con el término de piroplásmidos (del latín *pirum*, cuyo significado es pera en castellano y hace referencia a la morfología de estos parásitos) (Carbonell y Soler, 2018), poseen un ciclo biológico indirecto o heteroxeno en el que las garrapatas son los vectores de transmisión. Su ciclo biológico es complejo y se desarrolla en varios huéspedes, un vertebrado y un invertebrado (garrapata dura o ixódido). En este ciclo se alternan fases de reproducción sexual (gametogonia) y asexual (esquizogonia y esporogonia). Siendo las formas evolutivas los gametos, los merozoítos y los esporozoítos, respectivamente. En el hospedador vertebrado (caballo, burro, mulo o cebra) se produce una de las fases asexuales del parásito (merogonia), por lo que en realidad se comporta como un intermediario, mientras que en el hospedador invertebrado (garrapata dura o ixódido), que sería el hospedador definitivo, se producen las fases gametogónica y esporogónica. Aún, a día de hoy, no está totalmente claro cómo es el desarrollo de estos parásitos en las garrapatas y parece ser que depende de la especie de ixódido involucrada (Rothschild, 2013; Wise *et al.*, 2013).

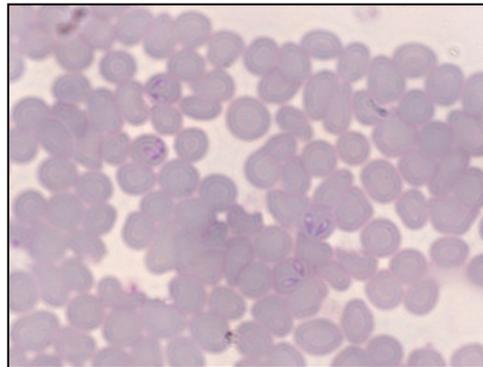
### 2.3.1.- Ciclo biológico de *Babesia caballi*

El ciclo biológico de *B. caballi* es el característico de cualquier Babesia, pues tiene una transmisión transovárica, por la cual el parásito pasa del intestino de la garrapata hasta el ovario de la hembra, penetrando en los huevos en formación e infectando a las larvas, las ninfas y los adultos de la siguiente generación (Navarrete y

Serrano, 1999). A continuación, describiremos las diferentes fases del ciclo biológico tanto en el hospedador vertebrado como en el hospedador invertebrado (vector).

### Hospedador vertebrado

El ciclo evolutivo podría comenzar cuando la garrapata infectada (en cualquier estadio) succiona sangre del hospedador. Los esporoblastos, estimulados por esta succión, se diferencian en esporozoítos (que poseen una longitud de 2,5  $\mu\text{m}$ ) que pasarán a luz alveolar y de aquí, vía salivar, llegarán al torrente sanguíneo del vertebrado (Mehlhorn y Schein, 1984). Dichos esporozoítos son vehiculados con la saliva transcurridas 48-72 horas desde el inicio de la alimentación. En este momento comienza la fase de **esquizogonia o merogonia** en el hospedador vertebrado (équido). Los esporozoítos, gracias a su complejo apical y a esterasas y proteasas, penetran en el eritrocito (Navarrete y Serrano, 1999). Tras esa penetración, se convierten en primer lugar en un trofozoíto de tipo anaplasmoide en el que predomina el material nuclear, y evoluciona posteriormente hasta una esfera amebode más grande, que se divide asexualmente por fisión binaria en dos cuerpos piriformes alargados que son los merozoítos, que miden 2-5 $\mu\text{m}$  de longitud y 1,3-3  $\mu\text{m}$  de diámetro (Rothschild, 2013; Wise *et al.*, 2013). Estos dos merozoítos, que reciben vulgarmente el nombre de piroplasmas, aparece normalmente unidos por sus extremos terminales, presentado una disposición de ángulo agudo. En este momento, se podrán observar en extensiones sanguíneas hematíes que pueden contener uno o dos merozoítos con aspecto piriforme, siendo ésta una característica diagnóstica propia de la infección por este parásito. A partir de

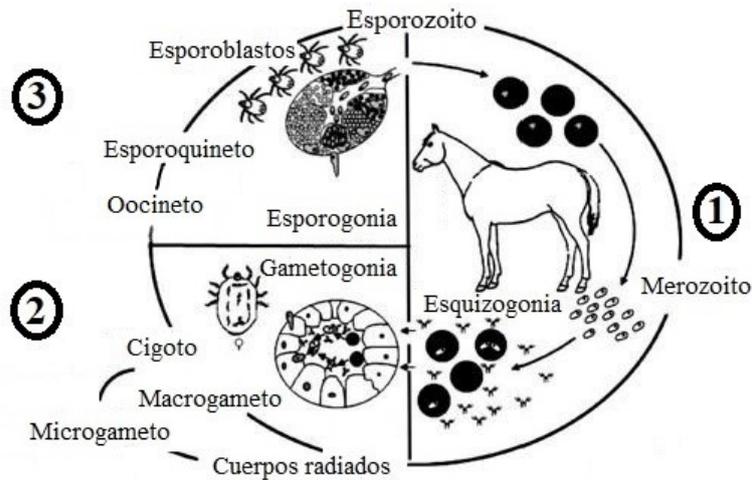


**FIGURA 1:** Merozoítos de *Babesia caballi* entonces, se lisará el glóbulo rojo y los merozoítos penetrarán en nuevas células sanguíneas, continuando así la multiplicación de *B. caballi* en el équido. Algunos de estos merozoítos se transforman en pre-gametocitos que estarán presentes en la sangre periférica (Chauvin *et al.*, 2009). Este proceso continúa sucesivamente y se ralentiza o finaliza cuando el sistema inmunitario del hospedador logra vencer al parásito, el tratamiento lo elimina del torrente sanguíneo o por el contrario el parásito acaba con la vida del hospedador vertebrado (Navarrete y Serrano, 1999).

### Hospedador invertebrado

El ciclo prosigue con la fase de **gametogonia**, que implica una reproducción sexual. Comienza cuando la garrapata ingiere sangre con hematíes infectados por merozoítos y pre-gametocitos. Estas formas parasitarias son liberadas en el intestino del ixódido al digerirse los glóbulos rojos. La mayoría de ellas son destruídas durante la digestión intestinal, pero otras (los pre-gametocitos) se convierten en gametocitos (Chauvin *et al.*, 2009), pequeños cuerpos redondos que flotan en el contenido intestinal (Rothschild, 2013). Estos cuerpos esféricos se transformarán en primer lugar en los cuerpos radiados o “ray bodies”, un estadio intermedio que posee numerosas prolongaciones citoplasmáticas (Chauvin *et al.*, 2009) y que fueron descritos por primera vez en 1906 por Koch (Mehlhorn *et al.*, 1980). Posteriormente, estos cuerpos evolucionarán dando lugar a los gametos masculinos y femeninos, que son morfológicamente indistinguibles (Jalovecka, 2018). Los gametos se unirán entre sí fusionando sus membranas primero y más tarde sus núcleos, formando un cigoto que posee un tamaño de entre 8 y 10  $\mu\text{m}$ . Los cigotos entran en las células intestinales y se convierten en formas móviles denominados ooquinetos (Chauvin *et al.*, 2009).

Los ooquinetos terminan de atravesar la pared intestinal y se inicia la fase de **esporogonia** (fase de reproducción asexual), que comienza con la formación de los esporoquinetos, los cuales viajarán por la hemolinfa hasta llegar a diferentes células de diversos tejidos y órganos de la garrapata, penetrando en hemocitos, células musculares, células del ovario, túbulos de Malpighi, etc. (Mehlhorn y Schein, 1984). Si este proceso se lleva a cabo en una garrapata macho, estas células morirán con él. Si sucede en una hembra, los esporoquinetos pasarán a los ovocitos y por tanto a la siguiente generación. Los esporoquinetos permanecerán latentes en los tejidos de la larva (incluso en las fases de ninfa y adulto) hasta que comience su alimentación, momento en que se activa la esporogonia, y así los esporoquinetos que han viajado por la hemolinfa hacia las glándulas salivares, entran en las células alveolares y, en su citoplasma se convierten en esporoblastos primero y en esporozoítos después. A partir de este momento, los parásitos podrán ser transmitidos a un nuevo hospedador vertebrado (Mehlhorn y Schein, 1984).



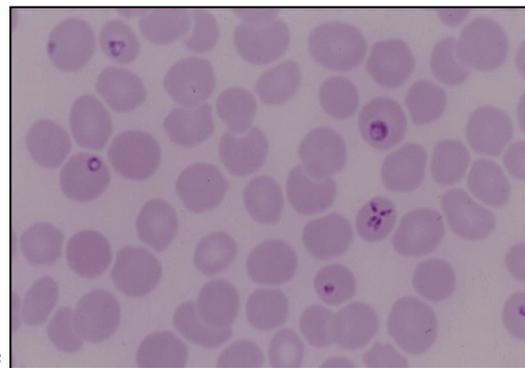
**FIGURA 2:** Ciclo biológico de *B. caballi*. Ilustración de Ueti, M. en Wise *et al.* (2013), adaptada por Montes Cortés, M.G.

- 1.- **Esquizogonia:** Reproducción asexual por fisión binaria de los merozoitos en el interior de hematíes.
- 2.- **Gametogonia:** Reproducción sexual en el intestino de la garrapata, con formación de un cigoto móvil (oocineto).
- 3.- **Esporogonia:** Reproducción asexual con formación de esporoquinetos que invaden el ovario de la garrapata entre otros tejidos. En la siguiente generación continuará su reproducción asexual en las glándulas salivares dando lugar a los esporozoitos infectantes.

### 2.3.2.- Ciclo biológico de *Theileria equi*

El ciclo biológico de *T. equi* pueden variar según la especie de garrapata que esté involucrada en la transmisión (Rothschild, 2013).

El ciclo evolutivo de *T. equi* tiene similitudes con el de *B. caballi*, pues posee una fase de multiplicación asexual en el hospedador vertebrado (esquizogonia o merogonia) y dos fases en el hospedador invertebrado, la de reproducción sexual (gametogonia) y otra de reproducción asexual (esporogonia). Pero hay que hacer distinciones, pues las *Theilerias* tienen una fase preeritrocítica que se desarrolla en los glóbulos blancos, en concreto en los linfocitos (Schein *et al.*, 1981), antes de reproducirse en los glóbulos rojos y, además, su transmisión es transtadial o fase a fase, a diferencia de lo que sucede con *B. caballi*, que es transovárica.



**FIGURA 3:** Merozoitos de *Theileria equi*

### Hospedador vertebrado

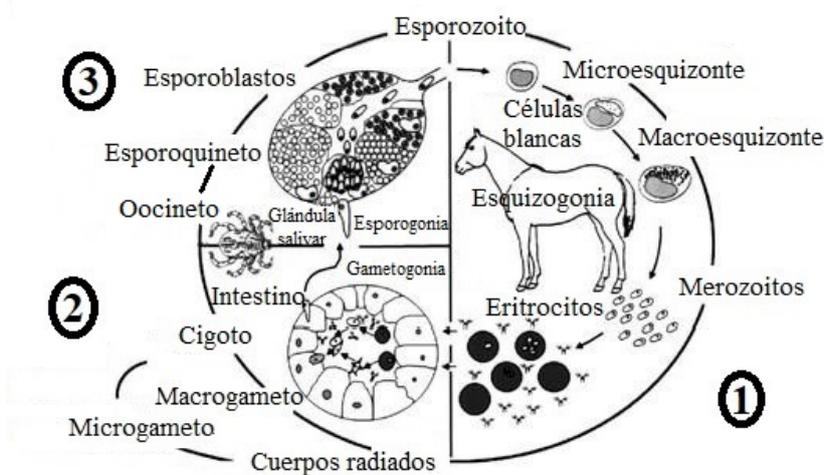
Una vez que la garrapata infectada ha comenzado a alimentarse en el hospedador vertebrado, se produce la transformación del esporoblasto en esporozoítos que serán vehiculados a la sangre del hospedador vertebrado. En este momento comenzará una **esquizogonia** intralinfocitaria o exoeritrocitaria, que es la primera diferencia marcada entre el ciclo biológico de los géneros *Theileria* y *Babesia*. Dentro de los glóbulos blancos se formarán esquizontes (cuerpos azules de Koch), que pueden apreciarse en nódulos linfoides a los 12-14 días tras la fijación de la garrapata infectada. Estas formas parasitarias darán lugar, en última instancia, a unos 200 merozoítos por célula parasitada, que miden cada uno de 1,5 a 2  $\mu\text{m}$  de largo y que quedan libres una vez que el linfocito es lisado (Mehlhorn y Schein, 1984; Rothschild, 2013). Concluida esta fase preeritrocítica, se produce la invasión de los eritrocitos (Schein, 1988). Así, los merozoítos se reproducen por fisión binaria dentro de los hematíes (reproducción asexual, **merogonia**). Esta reproducción asexual da lugar, a veces, a cuatro elementos parasitarios con forma de pera que miden unos 2  $\mu\text{m}$  de largo y 1,5  $\mu\text{m}$  de ancho (Levine, 1985; Moltmann *et al.*, 1983; Rothschild, 2013) y se disponen en cruz, forma que se denomina cruz de Malta (Levine, 1988; Schein, 1988), que es típica e indiscutible de una parasitación por *T. equi*. Después de la rotura de los glóbulos rojos parasitados, los merozoítos se liberan y penetran en nuevos eritrocitos y siguen multiplicándose. Estas células (merozoítos) pueden observarse durante la fase aguda de la enfermedad mediante parasitoscopia. Algunos de estos merozoítos adoptan formas esféricas germinativas, similares a anillos y que se cree que pudieran ser los gamontes (Mehlhorn y Schein, 1988; Rothschild, 2013).

### Hospedador invertebrado

Cuando una garrapata inmadura (larva o ninfa) de una especie habilitada para la transmisión ingiere estos gamontes, se inicia la fase de **gametogonia**, que se lleva a cabo en el intestino del ixódido. Los gamontes se liberan cuando se lisan los eritrocitos y crecen en el intestino del ixódido, iniciándose la formación de los “ray bodies” o cuerpos radiados (Rothschild, 2013). Fueron Mehlhorn y Schein (1984) quienes demostraron la existencia de estas formas en el ciclo biológico de *T. equi*. Los cuerpos radiados poseen uno ó mas núcleos en su interior y miden de 3-5  $\mu\text{m}$  de longitud y de 0,4-0,8  $\mu\text{m}$  de diámetro. Sus proyecciones citoplasmáticas miden 1-2  $\mu\text{m}$  de largo (Zapf

y Schein, 1994). Después de 4-6 días tras la ingestión, los cuerpos radiados o gametos evolucionan hacia microgametos y macrogametos que se fusionarán y formarán los cigotos en el intestino (reproducción sexual) (Rothschild, 2013), de un tamaño aproximado de 13,5  $\mu\text{m}$  de largo y un diámetro de unos 2,2  $\mu\text{m}$  (Blouin y de Waal, 1989). El cigoto móvil u ooquineto pasará del intestino a la hemolinfa.

En este momento comienza la fase de **esporogonia**, pues los ooquinetos darán lugar a esporoquinetos tras una fase de reproducción asexual en la cavidad orgánica de la garrapata. Estos esporoquinetos serán conducidos por la hemolinfa a las células de tipo III de las glándulas salivares del siguiente estadio evolutivo (ninfa o adulto), tras el inicio de la alimentación de la garrapata (Rothschild, 2013), demostrándose así la transmisión transtadial de este parásito. En estas células salivares continúa la esporogonia, con la formación de esporontes, esporoblastos y esporozoítos. Convirtiéndose ésta en una garrapata infectante. El esporozoíto puede mostrar diferentes formas, desde ovoides, alargados hasta piriformes, con el núcleo en una posición excéntrica (Guimarães *et al.*, 1998).



**FIGURA 4:** Ciclo biológico de *T. equi*. Ilustración de Ueti, M. en Wise *et al.* (2013), adaptada por Montes Cortés, M.G.

- 1.- Esquizogonia:** Reproducción asexual. Con dos fases: fase intralinfocitaria o preeritrocítica, con formación de microesquizontes y macroesquizontes que dan lugar a los merozoítos, y posterior fase de replicación intraeritrocítica.
- 2.- Gametogonia:** Reproducción sexual. Formación de gametos en el intestino de la garrapata a partir de los gamontes, que posteriormente se transformarán en microgametos y macrogametos que al fusionarse formarán un cigoto móvil (ooquinet).
- 3.- Esporogonia:** Reproducción asexual. Los ooquinetos darán lugar a esporoquinetos, que vía hemolinfa llegarán a glándulas salivares donde formarán esporontes, esporoblastos y en última instancia a los esporozoítos.

## 2.4.- Contagio de la Piroplasmosis Equina

Como hemos dicho anteriormente, los piroplásmidos son transmitidos por la picadura de vectores pertenecientes a la familia *Ixodidae*, es decir, garrapatas duras. Los principales géneros de dicha familia implicados en la transmisión son *Dermacentor*, *Hyalomma* y *Rhipicephalus* (Friedhoff, 1988; de Waal, 1992; Uilenberg, 1995; Mehlhorn y Schein, 1998; Battsetseg *et al.*, 2001). Las especies que con mayor probabilidad estarían relacionadas con estas transmisiones en nuestro país serían *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma marginatum marginatum* y *Rhipicephalus bursa*, puesto que hemos comprobado que son los ixódidos que con mayor prevalencia encontramos parasitando a los caballos españoles. Aunque no deben olvidarse otras especies, que, aún siendo menos prevalentes, también podrían transmitir esta enfermedad, como son: *Hyalomma lusitanicum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus turanicus* o *Dermacentor reticulatus* (Habela *et al.*, 2005b; Montes y Habela, 2007).

Estos vectores succionan sangre del hospedador vertebrado parasitado, ingiriendo los hemoparásitos (de una especie u otra, o incluso ambas, pues son comunes las parasitaciones mixtas), los cuales evolucionan en el interior del hospedador invertebrado, siendo inoculados posteriormente a otro hospedador vertebrado cuando sucesivas fases evolutivas del vector se alimenten sobre él. Se ha demostrado que, aunque en un caballo portador no se detecten microscópicamente piroplasmas en sangre, las garrapatas que se alimenten sobre él sí podrían adquirir la infección, pues la saliva inoculada por las garrapatas atrae a los parásitos, que completarán en ella su desarrollo (Olmeda *et al.*, 2005).

Las parasitemias que se alcanzan en cada caso son diferentes, así, en el caso de *B. caballi* lo normal es que rondan entre 0,1-1% (de Waal, 1996), aunque pueden llegar a máximas de 10% (Holbrook, 1969). Sin embargo, la parasitemia en infecciones por *T. equi* puede rondar entre 1 y 7% (Friedhoff y Soulé, 1996), con un máximo de hasta el 95% (Holbrook, 1969).

Las garrapatas son reservorios para *B. caballi* porque este organismo persiste en las garrapatas durante varias generaciones incluso tras su alimentación en hospedadores refractarios. Al tener *Babesia caballi* transmisión transovárica, una sola hembra

infectada transmite el parásito a su descendencia (miles de larvas). En cambio, los caballos (hospedador vertebrado) son el reservorio conocido para *T. equi*, ya que en esta especie se produce una transmisión transestadial. Los machos de las garrapatas pueden transmitir *T. equi* a diferentes caballos, debido a que pueden alimentarse en distintos animales a lo largo de su vida. La mayor longevidad (comparada con la de las hembras) les permite ser un vector transmisor más eficaz (Friedhoff y Soulé, 1996). Para el contagio de *T. equi*, obligatoriamente deben intervenir garrapatas con ciclo de dos o tres hospedadores.

La transmisión de esta enfermedad no sólo se produce a través de ixódidos, sino que en ocasiones puede ser iatrogénica, es decir, causada por la mala praxis veterinaria, ya que se ha comprobado que transfusiones sanguíneas, jeringas o material quirúrgico contaminados pueden propagar la enfermedad (Gerstenberg *et al.*, 1999; Short *et al.*, 2012; Wise *et al.*, 2013). En países no endémicos podrían tener lugar brotes de enfermedad debidos a la transmisión de estos parásitos por el empleo de instrumentos contaminados (Chhabra *et al.*, 2012; Rothschild, 2013). También, se citan casos en los que la transmisión de *T. equi* puede ser transplacentaria (Phipps y Otter, 2004; Georges *et al.*, 2011; Chhabra *et al.*, 2012).

Desde un punto de vista epidemiológico, la PE en España se puede considerar como endémica inestable, puesto que la relación que existe entre el hospedador (équido), agente causal (piroplásmido), vector (garrapata) y medio ambiente es incompleta, por lo que pudieran presentarse casos clínicos de la enfermedad. Esta situación se torna más estable en regiones situadas más al sur, ya que la relación hospedador-parásito-medio ambiente es más estrecha, de tal forma que hay una ausencia virtual de casos clínicos, lo que implica una mayor adaptación evolutiva entre el hemoparásito y su hospedador (Sevilla, 2005). Así pues, hay una perfecta adaptación entre el parásito, el hospedador vertebrado y el vector, asegurándose de este modo la supervivencia de todos ellos. Los caballos infectados de PE, muy probablemente no morirán por esta causa. Los parásitos sobrevivirán en la sangre del hospedador vertebrado, aunque sea acantonados en órganos internos como el pulmón, el bazo (Ribeiro *et al.*, 2013) o la médula ósea (Pitel *et al.*, 2010). Incluso en las propias garrapatas que actúan como reservorios sin llegar a verse afectadas (Olmeda *et al.*, 2005). Resultan muy frecuentes las reinfecciones a lo largo de la vida de los équidos

presentes en zonas endémicas (Schein, 1988; Knowles *et al.*, 1994). Por tanto, el estado más seguro para los caballos que habitan zonas endémicas será el de permanecer infectados de por vida (portadores crónicos), manteniendo un estado inmunológico que se denomina de premunidad o inmunidad no estéril. De esta manera, tendrá capacidad de defensa ante nuevas infecciones que pudieran generar cuadros agudos, pero sin llegar a eliminar por completo el parásito del torrente circulatorio, evitando de este modo, sufrir recidivas y muertes por esta enfermedad. Sin embargo, aquellas situaciones extremas de inmunocompromiso (Soulé, 1997), como ocurre, por ejemplo, en corticoterapias de larga duración, enfermedades concomitantes o situaciones de estrés, como el ejercicio extenuante (de Waal *et al.*, 1987; Oladosu y Olufemi, 1992; Habela *et al.*, 1995; Hailat *et al.*, 1997; Navarrete y Serrano, 1999; Rhalem *et al.*, 2001; Abutarbush *et al.*, 2012), propiciarían la reaparición de nuevos cuadros clínicos.

Se ha demostrado que la infección por *T. equi* será de por vida para el animal (pues no puede eliminarse fácilmente ni por mecanismos inmunitarios ni con medios terapéuticos). Sin embargo, la situación para *B. caballi* es diferente, pues este parásito sí puede desaparecer de los équidos infectados, permaneciendo como portadores durante períodos de 1-4 años (Hourrigan y Knowles, 1979; Schein, 1988; de Waal, 1992; de Waal y van Heerden, 1994).

En las zonas endémicas, el contacto entre los potros y las garrapatas suele suceder a edades muy tempranas, momento durante el cual se supone están protegidos por los anticuerpos calostrales ingeridos los primeros días de vida (Heuchert *et al.*, 1999). Estos anticuerpos confieren protección durante unos cuatro meses (Donnelly *et al.*, 1982; Heuchert *et al.*, 1999; Rüegg *et al.*, 2006, 2008). Posteriormente, el sistema inmunitario del potro estaría lo suficientemente desarrollado como para responder a la infección. La transmisión de anticuerpos de madre a potro vía calostrales se ha podido constatar serológicamente por inmunofluorescencia indirecta (Coletto, 1999).

Otro caso diferente sería el derivado de la introducción de caballos desde zonas libres a zonas endémicas. El contacto de estos caballos con el parásito puede llevarlos a enfermar y morir por esta causa (Olmeda *et al.*, 2005).

## 2.5.- Distribución geográfica y prevalencia

La PE está distribuida por diferentes continentes como Europa, África, Asia y América, como ya indicábamos anteriormente. Es de destacar que las prevalencias en los diferentes países que conforman estos continentes oscilan entre el 0,3% hasta prácticamente el 100%, como se puede observar en las tablas que contiene este apartado.

Pocos son los países que están situados en zonas libres de esta enfermedad, entre ellos podemos citar a Australia, Irlanda, Islandia o Canadá. Por lo general, la prevalencia de *T. equi* es superior a la de *B. caballi*, aunque en ciertos países se invierte esta tendencia.

A continuación, analizaremos la situación de distintos países ubicados en diferentes continentes. En primer lugar, **África**, donde podemos observar que la prevalencia de *T. equi* es superior a la de *B. caballi* en todos los estudios y países, independientemente de la técnica diagnóstica empleada.

**Tabla 1. Datos publicados sobre la prevalencia de *B. caballi* y *T. equi* en países de África**

Pais	Nº muestras analizadas	Agente causal	Método diagnóstico (*)	Prevalencia (%)	Prevalencia Total (%)	Referencia
Egipto	100	<i>T. equi</i>	iELISA (Voller <i>et al.</i> , 1980)	30,0		Ibrahim <i>et al.</i> (2011)
			PCR <i>18S rRNA</i> (este estudio)	26,0		
Egipto	88	<i>B. caballi</i>	IFI (kit comercial VMRD®, EEUU)	17,0		Mahmoud <i>et al.</i> (2016)
			cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	0		
			nPCR <i>RAP-1</i> (Baptista <i>et al.</i> , 2013)	19,3		
		<i>T. equi</i>	IFI (kit comercial VMRD®, EEUU)	23,9		
			cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	14,8		
			nPCR <i>EMA-1</i> (Schwint <i>et al.</i> , 2008)	36,4		
Sudáfrica	92	<i>B. caballi</i>	IFI (Tenter y Friedhoff, 1986)	52,17		Motloang <i>et al.</i> (2008)
			PCR <i>RAP-1</i> (este estudio)	0		
		<i>T. equi</i>	IFI (Tenter y Friedhoff, 1986)	97,83		
			PCR <i>EMA-1</i> (este estudio)	5,43		
Sudáfrica	41	<i>B. caballi</i>	IFI (OIE, 2008)	70,0		Bhoora <i>et al.</i> (2010a)
			RLB <i>18S rRNA</i> (Nijhof <i>et al.</i> , 2005)	0		
			RT-qPCR <i>18S rRNA</i> (Kim <i>et al.</i> , 2008)	78,0		
		<i>T. equi</i>	IFI (OIE, 2008)	83,0		
			RLB <i>18S rRNA</i> (Nijhof <i>et al.</i> , 2005)	73,0		
			RT-qPCR <i>18S rRNA</i> (Kim <i>et al.</i> , 2008)	80,0		
Sudáfrica	1237	<i>B. caballi</i>	IFI (OIE, 2008)	5,09		Bhoora <i>et al.</i> (2010b)
			cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	0		
			PCR <i>RAP-1</i> (este estudio)	0		
		<i>T. equi</i>	IFI (OIE, 2008)	22,15		
			cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	21,42		

Continuación de la tabla 1						
País	Nº muestras analizadas	Agente causal	Método diagnóstico (*)	Prevalencia (%)	Prevalencia Total (%)	Referencia
Sudáfrica	107	<i>T. equi</i>	IFI (OIE, 2008)	84,11		Bhoora <i>et al.</i> (2010c)
			cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	82,24		
			Cultivo <i>in vitro</i>	84,11		
			RT-qPCR <i>18S rRNA</i> (Kim <i>et al.</i> , 2008)	85,98		
			RT-qPCR <i>EMA-1</i> (Ueti <i>et al.</i> , 2003)	62,62		
			RT-qPCR <i>EMA-1</i> (este estudio)	84,11		
Sudán	ELISA <i>B. caballi</i> = 158	<i>B. caballi</i>	ELISA <i>RAP-1</i> (este estudio)	4,4		Salim <i>et al.</i> (2008)
			PCR <i>RAP-1</i> (este estudio)	0		
	ELISA <i>T. equi</i> = 126 PCR = 131	<i>T. equi</i>	ELISA <i>EMA-2</i> (este estudio)	63,5		
			PCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	33,0		
			PCR <i>EMA-1</i> (este estudio)			
Sudán (caballos y burros)	499	<i>B. caballi</i>	PCR <i>18S rRNA</i> (Oosthuizen <i>et al.</i> , 2008; Matjila <i>et al.</i> , 2008)	0	35,95	Salim <i>et al.</i> (2013)
			PCR <i>18S rRNA</i> (Bashiruddin <i>et al.</i> , 1999)			
			PCR <i>RAP-1</i> (Salim <i>et al.</i> , 2008)			
		<i>T. equi</i>	PCR <i>18S rRNA</i> (Oosthuizen <i>et al.</i> , 2008; Matjila <i>et al.</i> , 2008)	35,95		
			PCR <i>18S rRNA</i> (este estudio)			

(\*) Marca comercial del método diagnóstico empleado y/o autores que diseñan el protocolo correspondiente.

En el caso de **Asia**, podemos ver que, en general, al comparar los resultados obtenidos en los diferentes estudios, la prevalencia de *T. equi* es superior a la de *B. caballi*, tal y como sucedía en África.

Tabla 2. Datos publicados sobre la prevalencia de *B. caballi* y *T. equi* en Asia

País	Nº muestras analizadas	Agente causal	Método diagnóstico (*)	Prevalencia (%)	Prevalencia Total (%)	Referencia
Arabia Saudita	241	<i>B. caballi</i>	IFI (kit comercial Fuller Labor.®, EEUU)	7,5		Alanazi <i>et al.</i> (2012)
		<i>T. equi</i>	IFI (kit comercial Fuller Labor.®, EEUU)	10,4		
		Parasitación mixta	IFI (kit comercial Fuller Labor.®, EEUU)	3,0		
Arabia Saudita	141	<i>T. equi</i>	RT-PCR <i>18S rRNA</i> (Kim <i>et al.</i> , 2008)	42,0		Alanazi <i>et al.</i> (2014)
China	70	<i>B. caballi</i>	ELISA <i>RAP-1</i> (Ikadai <i>et al.</i> , 1999, 2000)	24,3		Xuan <i>et al.</i> (2002)
		<i>T. equi</i>	ELISA <i>EMA-1</i> (Xuan <i>et al.</i> , 2001b)	40,0		
		Parasitación mixta	ELISA	15,7		
China	111	<i>B. caballi</i>	ELISA <i>RAP-1</i> (Ikadai <i>et al.</i> , 1999, 2000)	32,0		Xu <i>et al.</i> (2003)
		<i>T. equi</i>	ELISA <i>EMA-1</i> (Xuan <i>et al.</i> , 2001b)	34,0		
		Parasitación mixta	ELISA	12,0		
China	1990	<i>B. caballi</i>	ELISA <i>RAP-1</i> (Xuan <i>et al.</i> , 2001c)	51,16		Wang <i>et al.</i> (2013)
		<i>T. equi</i>	ELISA <i>EMA-2</i> (Xuan <i>et al.</i> , 2001c)	11,51		
China	723	<i>T. equi</i>	PCR <i>EMA-1</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	40,8	40,8	Zhang <i>et al.</i> (2017)
Corea	184	<i>B. caballi</i>	cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	0	1,1	Seo <i>et al.</i> (2011)
			PCR <i>18S rRNA</i> (Criado-Fornelio <i>et al.</i> , 2003c; Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	0		
		<i>T. equi</i>	cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	1,1		
			PCR <i>18S rRNA</i> (Criado-Fornelio <i>et al.</i> , 2003c; Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	1,1		
		Parasitación mixta	cELISA (kit comercial VMRD®) y PCR	0		
Corea	224	<i>T. equi</i>	PCR <i>18S rRNA</i> (Criado-Fornelio <i>et al.</i> , 2003a; este estudio)	0,9	0,9	Seo <i>et al.</i> (2013)

Continuación de la tabla 2						
País	Nº muestras analizadas	Agente causal	Método diagnóstico (*)	Prevalencia (%)	Prevalencia Total (%)	Referencia
Dubai Emiratos Árabes	105	<i>B. caballi</i>	IFI (Kit comerc., Labor. Dr. Boese®, Alem.)	10,48	IFI y cELISA=36,2	Jaffer <i>et al.</i> (2010)
			cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	15,2		
		<i>T. equi</i>	IFI (Kit comerc., Labor. Dr. Boese®, Alem.)	32,4	RT-PCR=31,4	
			cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	32,4		
Parasitación mixta	IFI (Kit comerc., Labor. Dr. Boese®, Alem.)	12,4				
		cELISA (kit comercial VMRD®, EEUU)	12,4			
India	792	<i>T. equi</i>	ELISA <i>EMA-2</i> (Kumar <i>et al.</i> , 2013)	66,29	66,29	Dahiya <i>et al.</i> (2018)
India	464	<i>T. equi</i>	iELISA <i>EMA-2</i> (Kumar <i>et al.</i> , 2013)	49,78		Sumbria <i>et al.</i> (2016a)
			nPCR <i>18S rRNA</i> (Rampersad <i>et al.</i> , 2003; Allsopp <i>et al.</i> , 1994)	21,77		
Indonesia	235	<i>B. caballi</i>	ELISA <i>BC48</i> (Xuan <i>et al.</i> , 2001c)	6,4	Seropositivos (ELISA) = 8,5	Nugraha <i>et al.</i> (2018)
			nPCR <i>BC48</i> (Battsetseg <i>et al.</i> , 2001)	1,7		
		<i>T. equi</i>	ELISA <i>EMA-2</i> (Xuan <i>et al.</i> , 2001c)	2,1	Positivos (nPCR) = 2,1	
			nPCR <i>EMA-2</i> (este estudio)	0,4		
Irán	100	<i>B. caballi</i>	IFI (kit comercial MegaScreen®, Austria)	2,0		Abedi <i>et al.</i> (2014)
			mPCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	0		
		<i>T. equi</i>	IFI (kit comercial MegaScreen®, Austria)	48,0		
			mPCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	45,0		
		Parasitación mixta	IFI (kit comercial MegaScreen®, Austria)	3,0		
			mPCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	0		
Irán	105	<i>T. equi</i>	PCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	22,86	22,86	Bahrani <i>et al.</i> (2014)
Irán	240	<i>B. caballi</i>	mPCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	5,83		Malekifard <i>et al.</i> (2014)
			<i>T. equi</i>	mPCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)		
		Parasitación mixta	mPCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	1,66		
Irán	126	<i>T. equi</i>	PCR <i>EMA-1</i> (este estudio)	27,7	27,7	Ebrahimi <i>et al.</i> (2018)
Israel	361	<i>T. equi</i>	IFI (este estudio)	29,4		Shkap <i>et al.</i> (1998)
			ELISA <i>EMA-1</i> (Knowles <i>et al.</i> , 1991a, 1991b, 1992)	33,7		
Israel	590	<i>T. equi</i>	mPCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	26,4	26,4	Steinman <i>et al.</i> (2012)
Israel y Palestina	324	<i>T. equi</i>	cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	43,8	43,8	Aharonson <i>et al.</i> (2014)
Israel	273	<i>B. caballi</i>	cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	0,37		Rapoport <i>et al.</i> (2014)
			PCR <i>RAP-1</i> (Bhoora <i>et al.</i> , 2010a)	9,3		
Jordania	217	<i>B. caballi</i>	mPCR <i>18S rRNA</i> (Sloboda <i>et al.</i> , 2011)	6,0	Múltiplex-PCR=28,0	Qablan <i>et al.</i> (2013)
			<i>T. equi</i>	mPCR <i>18S rRNA</i> (Sloboda <i>et al.</i> , 2011)		
		Parasitación mixta	mPCR <i>18S rRNA</i> (Sloboda <i>et al.</i> , 2011)	0		
			"Catch-all"-PCR (Sloboda <i>et al.</i> , 2011)	28,6	Catchall-PCR=28,6	
Jordania	253	<i>B. caballi</i>	cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	0	14,6	Abutarbush <i>et al.</i> , (2011)
			PCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	0		
		<i>T. equi</i>	cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	14,6		
			mPCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	0		
Japón	2019	<i>B. caballi</i>	ELISA <i>RAP-1</i> (Ikadai <i>et al.</i> , 1999, 2000)	5,4		Ikadai <i>et al.</i> (2002)
			<i>T. equi</i>	ELISA <i>EMA-1</i> (Xuan <i>et al.</i> , 2001b)		
Mongolia	110	<i>B. caballi</i>	IFI (este estudio)	84,5		Avarzed <i>et al.</i> (1997a)
			<i>T. equi</i>	IFI (este estudio)		
Mongolia	209	<i>B. caballi</i>	ELISA <i>RAP-1</i> (este estudio)	46,4	46,4	Ikadai <i>et al.</i> (2000)
Mongolia	254	<i>B. caballi</i>	ELISA <i>RAP-1</i> (Ikadai <i>et al.</i> , 1999)	40,1		Boldbaatar <i>et al.</i> (2005)
			<i>T. equi</i>	ELISA <i>EMA-1</i> (Xuan <i>et al.</i> , 2001a, 2001b)		
		Parasitación mixta	ELISA	30,7		
Mongolia	192	<i>B. caballi</i>	mPCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	1,2		Sloboda <i>et al.</i> (2011)
			<i>T. equi</i>	mPCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)		
		Parasitación mixta	mPCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	1,2		

Continuación de la tabla 2						
País	Nº muestras analizadas	Agente causal	Método diagnóstico (*)	Prevalencia (%)	Prevalencia Total (%)	Referencia
Mongolia	250	<i>B. caballi</i>	cELISA <i>RAP-1</i> (Xuan <i>et al.</i> , 2001c)	51,6	cELISA= 81,6	Munkhjargal <i>et al.</i> (2013)
			nPCR <i>RAP-1</i> (Battsetseg <i>et al.</i> , 2002a)	42,4		
		<i>T. equi</i>	cELISA <i>EMA-2</i> (Xuan <i>et al.</i> , 2001c)	19,6		
			nPCR <i>EMA-1</i> (Battsetseg <i>et al.</i> , 2002a)	6,4		
		Parasitación mixta	cELISA (Xuan <i>et al.</i> , 2001c)	10,4	nPCR= 51,2	
			nPCR (Battsetseg <i>et al.</i> , 2002a)	2,4		
Paquistán	65	<i>B. caballi</i>	cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	24,6		Hussain <i>et al.</i> (2014)
		<i>T. equi</i>	cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	56,9		
		Parasitación mixta	cELISA (kit comercial VMRD®, EEUU)	12,3		
República de Filipinas	105	<i>B. caballi</i>	Inmunocromatografía (ICT) (Huang <i>et al.</i> 2006b)	10,50		Ybañez <i>et al.</i> (2018)
			PCR (Ikadai <i>et al.</i> 1999)	2,00		
		<i>T. equi</i>	Inmunocromatografía (ICT) (Huang <i>et al.</i> 2006b)	11,50		
			PCR (Battsetseg <i>et al.</i> , 2002b)	21,90		
Tailandia (caballos y mulos)	240	<i>B. caballi</i>	IFI (Avarzed <i>et al.</i> , 1997a)	5,00		Kamyngkird <i>et al.</i> (2014)
			ELISA <i>RAP-1</i> (Terkawi <i>et al.</i> , 2012)	2,50		
			PCR <i>I8 S rRNA</i> (primers modificados de Gubbels <i>et al.</i> , 1999)	0		
		<i>T. equi</i>	IFI (Avarzed <i>et al.</i> , 1997a)	8,75		
			ELISA <i>EMA-2</i> (Kumar <i>et al.</i> , 2004; Terkawi <i>et al.</i> , 2012)	5,42		
			PCR <i>I8 S rRNA</i> (primers modificados de Gubbels <i>et al.</i> , 1999)	1,25		
Turquía	200	<i>B. caballi</i>	PCR <i>RAP-1</i> (este estudio)	3,0	10,0	Güçlü y Karaer, (2007)
		<i>T. equi</i>	PCR <i>EMA-1</i> (este estudio)	7,0		
Turquía	481	<i>B. caballi</i>	cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	0,83	18,50	Sevinc <i>et al.</i> (2008)
		<i>T. equi</i>	cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	16,21		
		Parasitación mixta	cELISA (kit comercial VMRD®, EEUU)	1,46		
Turquía	84	<i>B. caballi</i>	IFI (kit comercial Fuller Labor.®, EEUU)	38,0		Acici <i>et al.</i> (2008)
		<i>T. equi</i>	IFI (kit comercial Fuller Labor.®, EEUU)	23,8		
		Parasitación mixta	IFI (kit comercial Fuller Labor.®, EEUU)	5,6		
Turquía	125	<i>B. caballi</i>	IFI (kit comercial Fuller Labor.®, EEUU)	9,6	18,4	Karatepe <i>et al.</i> (2009)
		<i>T. equi</i>	IFI (kit comercial Fuller Labor.®, EEUU)	12,8		
		Parasitación mixta	IFI (kit comercial Fuller Labor.®, EEUU)	4,0		
Turquía	220	<i>B. caballi</i>	cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	0	56,8	Kurt y Yaman (2012)
		<i>T. equi</i>	cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	56,8		
Turquía	203	<i>B. caballi</i>	RT-PCR (Bhoora <i>et al.</i> , 2010)	1,97	4,93	Kizilarslan <i>et al.</i> (2015)
		<i>T. equi</i>	RT-PCR (Bhoora <i>et al.</i> , 2010)	2,96		
Turquía	125	<i>B. caballi</i>	mPCR <i>I8S rRNA</i> (Sloboda <i>et al.</i> , 2011)	0	8,8	Guven <i>et al.</i> (2017)
		<i>T. equi</i>	mPCR <i>I8S rRNA</i> (Sloboda <i>et al.</i> , 2011)	8,8		

(\*) Marca comercial del método diagnóstico empleado y/o autores que diseñan el protocolo correspondiente.

En el **continente americano** la situación prácticamente no cambia, pues son más los estudios que indican que la prevalencia de *T. equi* es superior que la de *B. caballi*. En ciertos casos, las prevalencias son superiores a las encontradas en países de otros continentes, pudiendo llegar a rondar el 90% (Tabla 3).

Destacar que son pocos los estudios seroepidemiológicos realizados en América del Norte y, por tanto, poca la información disponible (Tabla 4).

**Tabla 3. Datos publicados sobre la prevalencia de *B. caballi* y *T. equi* en Centroamérica y Sudamérica**

País	Nº muestras analizadas	Agente causal	Método diagnóstico (*)	Prevalencia (%)	Prevalencia Total (%)	Referencia
Brasil	47	<i>B. caballi</i>	ELISA <i>RAP-1</i> (Ikadai <i>et al.</i> , 1999,2000)	81	96	Xuan <i>et al.</i> (2001c)
		<i>T. equi</i>	LAT <i>EMA-1</i> (Xuan <i>et al.</i> , 2001a, 2001b)	90		
Brasil	121	<i>T. equi</i>	IFI (Tenter y Friedhoff, 1986)	73,55	73,55	Botteon <i>et al.</i> (2002)
Brasil	487	<i>B. caballi</i>	IFI (Tenter y Friedhoff, 1986)	83,0		Heim <i>et al.</i> (2007)
			MRT-PCR <i>RAP-1</i> (este estudio)	12,5		
		<i>T. equi</i>	IFI (Tenter y Friedhoff, 1986)	91,0		
			MRT-PCR <i>EMA-1</i> (Ueti <i>et al.</i> , 2003)	59,7		
Parasitación mixta	MRT-PCR	8,6				
Brasil	380	<i>T. equi</i>	IFI (Baldani <i>et al.</i> , 2004)	35,8		Golynski <i>et al.</i> (2008)
			iELISA Ag crudo (Baldani <i>et al.</i> , 2004)	31,6		
Brasil	590	<i>T. equi</i>	mPCR (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	26,4	26,4	Steinman <i>et al.</i> (2012)
Brasil	174	<i>T. equi</i>	iELISA Ag crudo (Baldani <i>et al.</i> , 2004)	74,14	74,14	De Campos <i>et al.</i> (2013)
Brasil	198	<i>B. caballi</i>	cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	69,2	97,5	Vieira <i>et al.</i> (2013)
		<i>T. equi</i>	cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	78,3		
		Parasitación mixta	cELISA (kit comercial VMRD®, EEUU)	50,0		
Brasil	400	<i>T. equi</i>	iELISA Antígeno crudo (Baldani <i>et al.</i> 2004)	61,0	61,0	Prochno <i>et al.</i> (2014)
Brasil	119	<i>T. equi</i>	IFI (Vieira <i>et al.</i> , 2015)	59,6		Ferreira <i>et al.</i> (2016)
			PCR (Kumar <i>et al.</i> , 2004)	50,4		
Brasil	506	<i>T. equi</i>	IFI (IICA, 1987)	57,0	57,0	Guimarães <i>et al.</i> (2017)
Brasil	430	<i>B. caballi</i>	cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	58,6		Lobanov <i>et al.</i> (2018)
			RT-qPCR <i>18S rRNA</i> (Bhoora <i>et al.</i> , 2010a)	7,9		
			Dúplex RT-qPCR	9,3		
		<i>T. equi</i>	cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	87,4		
			RT-qPCR <i>EMA-1</i> (este estudio)	90,5		
			Dúplex RT-qPCR	87,9		
Colombia	82	<i>B. caballi</i>	IFI (Tenter y Friedhoff, 1986)	90,0		Tenter <i>et al.</i> (1988)
			RFC (Holbrook <i>et al.</i> , 1971)	41,0		
		<i>T. equi</i>	IFI (Tenter y Friedhoff, 1986)	94,0		
			RFC (Holbrook <i>et al.</i> , 1971)	65,0		
Costa Rica	130	<i>B. caballi</i>	cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	69,2		Posada-Guzmán <i>et al.</i> (2015)
			nPCR <i>RAP-1</i> (Battsetseg <i>et al.</i> , 2002a)	20,0		
		<i>T. equi</i>	cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	88,5		
			nPCR <i>EMA-1</i> (Battsetseg <i>et al.</i> , 2002a)	46,2		
Cuba	100	<i>B. caballi</i>	nPCR <i>RAP-1</i> (Ikadai <i>et al.</i> , 1999; Battsetseg <i>et al.</i> , 2002a)	5,0	78,0	Díaz-Sánchez <i>et al.</i> (2018)
		<i>T. equi</i>	nPCR <i>EMA-1</i> (Battsetseg <i>et al.</i> , 2002a)	53,0		
		Parasitación mixta	nPCR <i>RAP-1</i> y <i>EMA-1</i>	20,0		
Méjico	248	<i>B. caballi</i>	IFI (este estudio)	27,4	61,7	Cantú-Martínez <i>et al.</i> (2012)
		<i>T. equi</i>	IFI (este estudio)	45,2		
		Parasitación mixta	IFI (este estudio)	10,9		
Méjico	348	<i>T. equi</i>	nPCR <i>EMA-1</i> (Battsetseg <i>et al.</i> , 2001)	26,72	26,72	Ayala-Valdovinos <i>et al.</i> (2014)
Méjico	1000	<i>T. equi</i>	nPCR <i>EMA-1</i> (Alhassan <i>et al.</i> 2007b, este estudio)	19,7	19,7	Ayala-Valdovinos <i>et al.</i> (2017)
Trinidad y Tobago	93	<i>B. caballi</i>	IFI (kit comercial Fuller Labor.®, EEUU)	68,8	82,8	Asgarali <i>et al.</i> (2007)
		<i>T. equi</i>	IFI (kit comercial Fuller Labor.®, EEUU)	33,3		
		Parasitación mixta	IFI (kit comercial Fuller Labor.®, EEUU)	19,4		
Venezuela	360	<i>B. caballi</i>	cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	70,6		Mujica <i>et al.</i> (2011)
		<i>T. equi</i>	cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	50,3		
		Parasitación mixta	cELISA (kit comercial VMRD®, EEUU)	35,56		

Continuación de la tabla 3						
País	Nº muestras analizadas	Agente causal	Método diagnóstico (*)	Prevalencia (%)	Prevalencia Total (%)	Referencia
Venezuela	cELISA = 694	<i>B. caballi</i>	cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	23,2	cELISA = 50,2	Rosales <i>et al.</i> (2013)
			mPCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	4,4		
		<i>T. equi</i>	cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	14,0		
			mPCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	61,8		
	mPCR = 136	Parasitación mixta	cELISA (kit comercial VMRD®, EEUU)	13,0	mPCR = 66,2	
			mPCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	4,4		

(\*) Marca comercial del método diagnóstico empleado y/o autores que diseñan el protocolo correspondiente.

**Tabla 4. Datos publicados sobre la prevalencia de *B. caballi* y *T. equi* en Norteamérica**

Estado	Nº muestras analizadas	Agente causal	Método diagnóstico (*)	Prevalencia (%)	Prevalencia Total (%)	Referencia
Florida	210	<i>B. caballi</i>	RFC (OIE, 2008), IFI (OIE, 2008), cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU) y nPCR (Zahler <i>et al.</i> , 2000)	0	9,52	Short <i>et al.</i> (2012)
		<i>T. equi</i>	RFC (OIE, 2008), IFI (OIE, 2008), cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU) y nPCR (Zahler <i>et al.</i> , 2000)	9,52		

(\*) Marca comercial del método diagnóstico empleado y/o autores que diseñan el protocolo correspondiente.

En **Europa**, la PE está presente en numerosos países como Portugal, España, Francia, Italia, Hungría, Rumanía, e incluso Rusia. Otros países están libres de la enfermedad, aunque esporádicamente sufren brotes de enfermedad, entre ellos cabe citar a Bélgica, Austria, Polonia o la República Checa (Rothschild, 2013).

A continuación, podemos observar los datos de prevalencia relacionados con diferentes países europeos. Los resultados publicados son dispares, pues la prevalencia de *T. equi* es superior a la de *B. caballi* en países como Rumanía y Portugal. Mientras que en otros se invierte esta tendencia, como sucede en Holanda. Incluso en ciertos países (Italia), dependiendo del trabajo consultado, puede ser superior la prevalencia de *T. equi* o bien la de *B. caballi* (Tabla 5).

**Tabla 5. Datos publicados sobre la prevalencia de *B. caballi* y *T. equi* en Europa**

País	Nº muestras analizadas	Agente causal	Método diagnóstico (*)	Prevalencia (%)	Prevalencia Total (%)	Referencia
Región de los Balcanes	142	ADN de piroplásmido	PCR <i>18S rRNA</i> (Olmeda <i>et al.</i> , 1997; Muhlneckel <i>et al.</i> , 2002)	25,4	25,4	Davitkov <i>et al.</i> (2016)
		<i>B. caballi</i>	mPCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	22,5		
		<i>T. equi</i>	mPCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	2,1		
		Parasitación mixta	mPCR <i>18S rRNA</i> (Alhassan <i>et al.</i> , 2005)	0,7		
Eslovaquia	39	<i>T. equi</i>	PCR <i>18S rRNA</i> (Casati <i>et al.</i> , 2006; Hornok <i>et al.</i> , 2014)	0	0	Slivinska <i>et al.</i> (2016)
Francia	111	<i>B. caballi</i>	PCR <i>18S rRNA</i> (este estudio)	1,80		Fritz, D. (2010)
		<i>T. equi</i>	PCR <i>18S rRNA</i> (este estudio)	86,0		

Continuación de la tabla 5						
País	Nº muestras analizadas	Agente causal	Método diagnóstico (*)	Prevalencia (%)	Prevalencia Total (%)	Referencia
Francia	443	<i>B. caballi</i>	RFC (OIE, 2002)	12,9		Guidi <i>et al.</i> (2015)
		<i>T. equi</i>	RFC (OIE, 2002)	58,0		
Grecia	524	<i>B. caballi</i>	cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	1,1		Kouam <i>et al.</i> (2010)
		<i>T. equi</i>	cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	9,2		
		Parasitación mixta	cELISA (kit comercial VMRD®, EEUU)	0,8		
Holanda	300	<i>B. caballi</i>	IFI (Madden y Holbrook, 1986)	3,0	4,0	Butler <i>et al.</i> (2012)
			PCR-RLB <i>18S rRNA</i> (Nijhof <i>et al.</i> , 2005)	0		
		<i>T. equi</i>	IFI (Madden y Holbrook, 1986)	1,0		
			PCR-RLB <i>18S rRNA</i> (Nijhof <i>et al.</i> , 2005)	1,6		
		Parasitación mixta	IFI (Madden y Holbrook, 1986)	1,0		
Hungria	IFI y ELISA = 324 PCR = 101	<i>T. equi</i>	IFI (kit comercial MegaScreen®, Austria)	32,0		Farkas <i>et al.</i> (2013)
			cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	32,0		
			PCR <i>18S rRNA</i> (Olmeda <i>et al.</i> , 1997; Muhlntickel <i>et al.</i> , 2002)	49,0		
Islas Azores	305	<i>T. equi</i>	cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	19,3		Baptista <i>et al.</i> (2013)
			nPCR <i>EMA-1</i> (este estudio)	14,8		
Italia	412	<i>B. caballi</i>	IFI (kit comercial Fuller Labor.®, EEUU)	17,9	68,4	Moretti <i>et al.</i> (2010)
		<i>T. equi</i>	IFI (kit comercial Fuller Labor.®, EEUU)	12,4		
		Parasitación mixta	IFI (kit comercial Fuller Labor.®, EEUU)	38,1		
Italia	294	<i>B. caballi</i>	IFI	0,3	8,5	Grandi <i>et al.</i> (2011)
			PCR <i>18S rRNA</i> (Bashiruddin <i>et al.</i> , 1999)	0		
		<i>T. equi</i>	IFI	8,2		
			PCR <i>18S rRNA</i> (Bashiruddin <i>et al.</i> , 1999)	3,0		
		Parasitación mixta	IFI	0		
Italia	1441	<i>B. caballi</i>	IFI (kit comercial Fuller Labor.®, EEUU)	1,9	34,7	Sgorbini <i>et al.</i> (2015)
		<i>T. equi</i>	IFI (kit comercial Fuller Labor.®, EEUU)	32,2		
		Parasitación mixta	IFI (kit comercial Fuller Labor.®, EEUU)	0,6		
Italia	300	<i>B. caballi</i>	IFI (kit comercial MegaScreen®, Austria)	26,0		Laus <i>et al.</i> (2013)
			PCR-RFLP <i>18S rRNA</i> (Centeno-Lima <i>et al.</i> , 2003; Herwald <i>et al.</i> , 2013)	0		
		<i>T. equi</i>	IFI (kit comercial MegaScreen®, Austria)	41,0		
			PCR-RFLP <i>18S rRNA</i> (Centeno-Lima <i>et al.</i> , 2003; Herwald <i>et al.</i> , 2003)	15,0		
		Parasitación mixta	IFI (kit comercial MegaScreen®, Austria)	14,7		
			PCR-RFLP <i>18S rRNA</i>	0		
Italia	135	<i>B. caballi</i>	Semi-nPCR <i>18S rRNA</i> (Zanet <i>et al.</i> , 2014)	0	13,33	Zanet <i>et al.</i> (2017)
		<i>T. equi</i>	Semi-nPCR <i>18S rRNA</i> (Zanet <i>et al.</i> , 2014)	13,33		
Polonia	76	<i>T. equi</i>	PCR <i>18S rRNA</i> (Casati <i>et al.</i> , 2006; Hornok <i>et al.</i> , 2014)	1,3	1,3	Slivinska <i>et al.</i> (2016)
Portugal	162	<i>B. caballi</i>	cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	11,1		Ribeiro <i>et al.</i> (2013a)
		<i>T. equi</i>	cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	17,9		
Reino Unido	RFC, IFI y cELISA = 1242 PCR= 1211	<i>B. caballi</i>	RFC (OIE, 2008)	3,5	4,4	Coulthous <i>et al.</i> (2018)
			IFI (OIE, 2008)	6,6		
			cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	0,6		
			PCR (Criado-Fornelio <i>et al.</i> , 2003a; Oura <i>et al.</i> , 2004)	0		
		<i>T. equi</i>	RFC (OIE, 2008)	6,4	5,9	
			IFI (OIE, 2008)	8,4		
			cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	1,8		
			PCR (Criado-Fornelio <i>et al.</i> , 2003a; Oura <i>et al.</i> , 2004)	0,8		
Rumanía	178	<i>B. caballi</i>	mPCR (Sloboda <i>et al.</i> , 2011)	4,5	Múltiplex-PCR= 43,26	Gallusová <i>et al.</i> (2014)
		<i>T. equi</i>	mPCR (Sloboda <i>et al.</i> , 2011)	38,8		
		Parasitación mixta	mPCR (Sloboda <i>et al.</i> , 2011)	2,8		
		Parasitación mixta	"Catch-all"-PCR (Sloboda <i>et al.</i> , 2011)	48,9		
					"Catch-all"-PCR= 48.9	

Continuación de la tabla 5						
País	Nº muestras analizadas	Agente causal	Método diagnóstico (*)	Prevalencia (%)	Prevalencia Total (%)	Referencia
Suiza	689	<i>B. caballi</i>	IFI (Tenter y Friedhoff, 1986)	1,5	7,3	Sigg <i>et al.</i> (2010)
		<i>T. equi</i>	IFI (Tenter y Friedhoff, 1986)	4,4		
		Parasitación mixta	IFI (Tenter y Friedhoff, 1986)	1,5		
Ucrania	100	<i>T. equi</i>	PCR <i>18S rRNA</i> (Casati <i>et al.</i> , 2006; Hornok <i>et al.</i> , 2014)	29,0	29,0	Slivinska <i>et al.</i> (2016)

(\*) Marca comercial del método diagnóstico empleado y/o autores que diseñan el protocolo correspondiente.

En último lugar, pero no por ello menos importante, vamos a referirnos a las investigaciones realizadas en **España**. Según los datos obtenidos en el Servicio Diagnóstico de la Unidad de Parasitología del Hospital Clínico de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura (UNEX), las cifras de seropositividad para el conjunto nacional, se cifran en torno al 52,5% para *T. equi* y en el 21,3% para *B. caballi* (Habela *et al.*, 2005a). Predomina *T. equi* en el conjunto peninsular excepto en la cornisa cantábrica, donde *B. caballi* alcanza prevalencias más altas que para el resto del país (Habela *et al.*, 1989; Habela *et al.*, 1995; Habela *et al.*, 1998a). Por ello, parece estar claro que esta enfermedad se encuentra distribuida por toda nuestra geografía, siendo por norma general, más prevalente *T. equi* que *B. caballi* (Tabla 6).

**Tabla 6. Datos publicados sobre la prevalencia de *B. caballi* y *T. equi* en España**

Comunidad autónoma	Nº muestras analizadas	Agente causal	Método diagnóstico (*)	Prevalencia (%)	Prevalencia Total (%)	Referencia
Andalucía	428	<i>B. caballi</i>	cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	7,9		García-Bocanegra <i>et al.</i> (2013)
		<i>T. equi</i>	cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	48,6		
Extremadura	500	<i>B. caballi</i>	IFI (Tenter y Friedhoff, 1986)	15	60,0	Habela <i>et al.</i> (1989)
		<i>T. equi</i>	IFI (Tenter y Friedhoff, 1986)	35		
		Parasitación mixta	IFI (Tenter y Friedhoff, 1986)	10		
Galicia	60	<i>B. caballi</i>	IFI (este estudio)	28,3		Camacho <i>et al.</i> (2005)
		<i>T. equi</i>	IFI (este estudio)	40		
		Parasitación mixta	IFI (este estudio)	20		
Valencia	40	<i>B. caballi</i>	IFI Camacho <i>et al.</i> (2005)	7,5	7,5	Vega <i>et al.</i> (2012)
		<i>T. equi</i>	IFI Camacho <i>et al.</i> (2005)	2,5		
		Parasitación mixta	IFI Camacho <i>et al.</i> (2005)	2,5		
Áreas del centro de España (Madrid y ambas Castillas)	536	<i>B. caballi</i>	cELISA <i>RAP-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	4,7		Camino <i>et al.</i> (2018)
		<i>T. equi</i>	cELISA <i>EMA-1</i> (kit comercial VMRD®, EEUU)	21,8		

(\*) Marca comercial del método diagnóstico empleado y/o autores que diseñan el protocolo correspondiente.

## 2.6.- Diagnóstico de la Piroplasmosis Equina

### 2.6.1.- Diagnóstico clínico-epidemiológico

Este tipo de diagnóstico está basado en la identificación de la sintomatología compatible y la presencia o no de garrapatas, vectores potenciales. Es un diagnóstico complicado, que se puede enmascarar bajo cualquier cuadro sintomático, sin embargo, puede ser orientativo (Böse *et al.*, 1995) y tener una relativa utilidad.

Existen diferentes factores que pueden hacer variar la patogénesis de la PE, entre ellos podemos encontrar los factores dependientes del parásito como son el género y especie (*T. equi* es mucho más patógena que *B. caballi*), la cepa, la dosis y el ritmo de infección. Parece ser que la variación genética del parásito estaría también ligada a su patogenicidad y virulencia (Sivakumar *et al.*, 2014). Existen unos factores dependientes del hospedador que también influirían, como son el estado nutricional, el sanitario, la edad, etc. Debido a todos estos factores, la mortalidad puede rondar alrededor del 5-10% en caballos que nacen en zonas endémicas (Rothschild, 2013). El último de los factores a destacar es el estado inmunitario, muy importante en sí, ya que animales de zonas endémicas suelen ser más resistentes debido a que se encuentran en estado de preinmunidad o inmunidad no estéril.

La PE es una enfermedad anemizante y febril, que, además puede presentar una sintomatología muy variada. El período de incubación oscila entre diez y veinte días. La sintomatología nerviosa (encefalitis) y las cojeras son frecuentes en la infección por *B. caballi*, debido a la oclusión de la luz de los capilares. A veces, *T. equi* puede provocar abortos por transmisión intrauterina (Guglielmone, 1995).



**FIGURA 5:** Mucosas ictericas de un caballo infectado por *T. equi*

Los mecanismos de acción patógena, en ambas infecciones, se basan en la liberación de sustancias farmacológicamente activas como son las esterases, las cuales provocarían la activación de la calicreína plasmática después de la multiplicación del parásito en la sangre. La calicreína provoca un aumento de la permeabilidad vascular y vasodilatación, generando así éstasis circulatorios y posteriormente un shock, que, sin duda, podría derivar en la muerte (Sevilla, 2005). Otro de los mecanismos de acción patógena es la autoinmunidad provocada por la formación de inmunocomplejos, generándose fenómenos de eritrofagocitosis (Levine, 1985), que se pueden observar fundamentalmente en el hígado y el bazo entre otros órganos.

En los inicios de la infección por *T. equi*, el sistema mononuclear fagocítico se ve afectado dando lugar a linfocitosis y posteriormente, a depleción y desorganización linfoide acompañada de leucopenia (Schein *et al.*, 1981).

La PE puede presentarse bajo diferentes formas clínicas: sobreaguda, aguda, subaguda y crónica. Pasamos a explicarlas brevemente:

- Presentación sobreaguda: tiene un curso de uno o dos días, sobreviniendo la muerte rápidamente. Se produce fundamentalmente en potros que sufren infección intrauterina (de Waal, 1992; Lewis *et al.*, 1999, Phipps y Otter, 2004), adultos que son introducidos en áreas con abundantes garrapatas infectadas (Maurer, 1962), situaciones de estrés, etc. (Hailat *et al.*, 1997). En potros tiene un mal pronóstico (Rothschild, 2013). La sintomatología en la infección por *B. caballi* deriva fundamentalmente de la obstrucción de los capilares en diferentes órganos y afección del sistema nervioso (Rothschild, 2013). En el caso de infecciones por *T. equi*, se producen las muertes principalmente como consecuencia de la anemia hemolítica (Holbrook, 1969).
- Presentación aguda: Existe un predominio del síndrome febril (con temperaturas que pueden superar los 40°C), deshidratación, mucosas congestionadas, taquipnea, taquicardia, sudoración, edemas (palpebrales, ventrales y de extremidades), lagrimeo intenso, rinorrea, cojeras, presencia de hemorragias en mucosas (oral, nasal, genital...) y una intensa crisis hemolítica. También se puede observar ictericia, hemoglobinuria y, en los casos muy graves, pueden aparecer crisis nerviosas con tambaleos,

convulsiones y sialorrea, pudiendo terminar el proceso en muerte (Maurer, 1962; de Waal, 1992; Friedhoff y Soulé, 1996; Taylor *et al.*, 1969; Schein, 1988). Puede afectar al aparato digestivo produciendo cólicos, constipación, diarrea o enteritis catarral (Maurer, 1962; de Waal, 1992; Taylor *et al.*, 1969). La muerte en zonas no endémicas como en China, puede rondar el 14% (Yin *et al.*, 1997) y en otras zonas elevarse fácilmente hasta el 50% (Rothschild, 2013). Otros síntomas más atípicos son el fallo renal y hepático (Maurer, 1962). Esta presentación es de fácil diagnóstico por la clínica y la abundante presencia de parásitos en el interior de los eritrocitos. Puede durar entre siete y doce días. La persistencia de hipertermia estimula el consumo de reservas orgánicas, produciéndose un adelgazamiento progresivo agravado por la disminución del apetito.

- Presentación subaguda: Los síntomas que se presentan son bastante atenuados, variando desde la anorexia, pérdida de peso, debilidad generalizada, fiebre intermitente, taquicardia, taquipnea, mucosas pálidas o ictericas, con petequias ocasionales. Puede aparecer constipación seguida de diarrea, hemoglobinuria o incluso esplenomegalia (Rothschild, 2013).
- Presentación crónica: La sintomatología es escasa, con signos inespecíficos que incluyen inapetencia, pérdida de peso, condición corporal pobre y poca resistencia al ejercicio físico. Puede haber una ligera anemia, pudiendo presentarse ictericia, así como ascitis (Rothschild, 2013). La duración del proceso puede rondar los 20 días.

Estas dos últimas formas pueden pasar inadvertidas al diagnóstico clínico o parasitológico directo convencional.

Durante el desarrollo de la enfermedad podemos encontrar alterados algunos parámetros hemáticos y bioquímicos, de hecho, se produce una anemia, que en un principio será normocítica y normocrómica sobre todo en los casos agudos (Rothschild, 2013). El hematocrito puede descender hasta valores por debajo del 20%, debido a hemólisis derivadas de las parasitemias que pueden oscilar entre el 0,2 y el 45% (Urquhart *et al.*, 1996; Rothschild, 2013). Igualmente, se produce una disminución de la

hemoglobina, hay hemoglobinuria sobre todo en el caso de infecciones por *T. equi* y también trombocitopenia (Mauser, 1962; de Waal, 1992), leucocitosis en las primeras fases y, posteriormente, leucopenia (Roberts *et al.*, 1962). Una marcada eosinofilia, debida a la presencia de los parásitos y mononucleosis son observadas en las primeras fases (Holmann *et al.*, 1993).

El diagnóstico anatomopatológico tampoco aporta información suficiente, pues el cuadro lesional se caracteriza por una diátesis hemorrágica generalizada acompañada de fenómenos de coagulación intravascular diseminada y una muerte por shock hipovolémico, siendo por lo tanto un cuadro bastante inespecífico y poco concluyente (Brüning, 1996).

Las lesiones son variadas y se aprecian en numerosos órganos y sistemas. Entre todas ellas, podemos destacar las que afectan al sistema nervioso como la encefalitis de tipo no purulento; hemorragias y edema alveolar en los pulmones; afecciones del corazón como miocarditis y endocarditis valvulares hemorrágicas, así como alteraciones en el hígado, como, por ejemplo, la hepatitis hemorrágica, la necrosis y la colangitis, todas ellas asociadas a una cierta hepatomegalia. El bazo podrá presentar un aumento de tamaño (esplenomegalia), hemorragias y congestión con una linfadenitis hiperplásica en los linfonodos. La glomerulonefritis, nefritis intersticial, hemorragias e infartos renales son lesiones habituales en los riñones. La hematuria no es infrecuente, debida a las hemorragias producidas en la vejiga urinaria, eliminándose así, una orina de color rojo a parduzco. También se podrá advertir la aparición de edemas subcutáneos y exudados serosos en cavidades. Además, pueden aparecer otras lesiones tales como gastritis hemorrágicas e incluso enteritis (Mahoney *et al.*, 1977; Levine, 1985; Kuttler, 1988b; Schein, 1988).

Por todo ello, no es aconsejable realizar solamente un diagnóstico clínico-epidemiológico o anatomopatológico, debiéndose recurrir a pruebas de tipo laboratorial, que bien pueden ser directas o indirectas.

El diagnóstico de la PE es más eficaz aplicando varios métodos diagnósticos, sin limitarse a sólo uno de ellos. Así, existen múltiples combinaciones entre las diferentes técnicas y una de las combinaciones más utilizadas es la constituida por la observación microscópica de frotis sanguíneos teñidos y técnicas serológicas como IFI o ELISA,

fundamentalmente en aquellos laboratorios en los que los métodos de biología molecular no están implantados.

### **2.6.2.- Diagnóstico parasitológico directo**

Los diferentes métodos de diagnóstico de PE que han sido y son más empleados en la actualidad, como son la observación al microscopio de extensiones de sangre teñidas o parasitoscopia, el cultivo *in vitro* y los métodos moleculares como la PCR.

#### **2.6.2.1.- Parasitoscopia**

Las extensiones sanguíneas teñidas con la tinción de Leishman, Giemsa o el Panóptico Rápido permiten la observación del parásito al microscopio óptico, especialmente en la fase aguda de la enfermedad (cuando la parasitemia es elevada), siendo muy complicada su detección en animales portadores crónicos o inaparentes (Taylor *et al.*, 1969; Todorovic y Carson, 1981; Kumar *et al.*, 1997; Zweygarth *et al.*, 1997; Krause, 2003; De Vera *et al.*, 2006; Balkaya y Erdogmus, 2006; Zobba *et al.*, 2008), ya que las parasitemias inferiores al 1% son muy difíciles de detectar por esta metodología (Hall *et al.*, 2013). En algunas ocasiones, incluso durante la fase aguda de la infección, la parasitación se mantiene en niveles tan bajos que aparecen falsos negativos (Friedhoff y Soulé, 1996.), sobre todo en el caso de *B. caballi*, donde las parasitemias pueden ser inferiores incluso al 0,1% (Wise *et al.*, 2013).

Es una prueba que posee una baja sensibilidad comparada con las pruebas moleculares como la PCR (Xuan *et al.*, 1998; Alhassan *et al.*, 2005; Bashiruddin *et al.*, 1999; Nicolaiewsky *et al.*, 2001; Rampersad *et al.*, 2003; Ibrahim *et al.*, 2011) y a veces resulta complicada la identificación del parásito causante en los frotis sanguíneos (Asgarali *et al.*, 2007), ya que la diferenciación del agente etiológico se realiza en base a las características morfológicas y morfométricas.

Pese a estos inconvenientes, se utiliza como una prueba más en estudios epidemiológicos, normalmente acompañado de otras técnicas, bien serológicas o moleculares (Potgieter *et al.*, 1992; Güçlü y Karaer, 2007; Al-Saad *et al.*, 2010; Kurt y Yaman, 2012).

### 2.6.2.2.- Cultivo *in vitro*

La parasitoscopia sólo es útil en los primeros días postinfección, es decir, en fase aguda. Sin embargo, los cultivos *in vitro* iniciados a partir de sangre fresca y estéril obtenida de un caballo portador pueden llegar a indicarnos si el animal está o no parasitado (Holman *et al.*, 1993; Zweygarth *et al.*, 1997).

Es un método que requiere la obtención de glóbulos rojos infectados del animal a estudiar. Estas células se añadirán al medio de cultivo, junto a glóbulos rojos de un donante no infectado y se incubarán en estufa con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Diariamente, se renovará el medio de cultivo y se realizará un frotis para determinar la parasitemia (Holman *et al.*, 1993, 1994). Los cultivos se realizarán específicamente para *B. caballi* (Avarzed *et al.*, 1997b; Zweygarth *et al.*, 1999; Ikadai *et al.*, 2001; Zweygarth *et al.*, 2002) o bien para *T. equi* (Zweygart *et al.*, 1995; Holman *et al.*, 1998), pues ambos parásitos tienen diferentes requerimientos para su crecimiento *in vitro* (Schuster, 2002).

Dentro de los inconvenientes de este método de diagnóstico, se pueden citar varios, por ejemplo, que es un método laborioso y en ocasiones lento, que requiere personal cualificado, lo que limita su aplicación como técnica diagnóstica de rutina. Además, resulta relativamente caro (Böse *et al.*, 1995) y, en algunos casos, animales que son seropositivos y supuestamente portadores pueden resultar ser negativos al cultivo y aislamiento. Autores como Bonfini *et al.* (2006), indican que es un buen método para la detección de équidos portadores, incluso negativos por métodos serológicos. También puede resultar de interés para valorar tratamientos en los animales. Pese a todas las desventajas mencionadas, no deja de ser un método aplicable para el diagnóstico de la PE, al menos como complemento a otras técnicas diagnósticas



FIGURA 6: Placa de cultivo



FIGURA 7: Frasco de cultivo (Flask)

(Baldani *et al.*, 2008), sobre todo si el animal es de elevado valor genético o se va a destinar a la exportación (Holman *et al.*, 1993).

En cualquier caso, el cultivo *in vitro* posee mayor sensibilidad en el diagnóstico de *T. equi* que para *B. caballi* (Alhassan *et al.*, 2007c), pudiendo deberse este hecho, a que la primera se multiplica más rápidamente que la segunda, alcanzando parasitemias más elevadas (Holman *et al.*, 1993).

El cultivo *in vitro* se ha utilizado para validar sueros como controles positivos y negativos empleados en la estandarización de tests serológicos y también para aislar cepas de estos parásitos sin la necesidad de realizar infecciones experimentales (Böse *et al.*, 1995).

### **2.6.2.3.- Métodos moleculares: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Esta técnica fue desarrollada a principios de los años ochenta por Kary Mullis (Rodríguez y Barrera, 2004). A lo largo de esa misma década, diferentes autores continuaron con su desarrollo (Saiki *et al.*, 1988), constituyendo en los últimos tiempos una verdadera revolución en el diagnóstico clínico y, por ello, de multitud de enfermedades.

Los métodos moleculares se basan fundamentalmente en la detección del material genético de un organismo o especie. La PCR es una técnica de biología molecular *in vitro* mediante la que se logra una amplificación específica de un fragmento del ADN molde. Este fragmento específico se amplifica al ser delimitado por una pareja de cebadores sintéticos. Tras realizar la amplificación, se obtiene un número de copias suficientes para su detección. Esta reacción consta de unos 30-40 ciclos repetitivos de polimerización, y en cada uno de estos ciclos se realizan tres pasos. El primero es la desnaturalización del ADN (ruptura de los enlaces entre las dos hebras de la molécula de ADN incubándolo a una temperatura elevada, normalmente 95°C). En la segunda fase se produce la hibridación o anillado del ADN molde con los cebadores. En esta fase, la temperatura puede variar según la temperatura de fusión de los oligonucleótidos, pero en general oscila entre 50-60°C. La última fase se lleva a cabo a una temperatura de 72°C, es la fase elongación de la hebra de ADN. Durante la misma, la ADN polimerasa realiza la extensión de la cadena complementaria empleando como patrón una de las hebras del ADN molde. Al final de cada uno de los ciclos, se obtiene el doble de moléculas del ADN molde, de tal manera que la técnica permite la

amplificación exponencial del fragmento de ADN deseado (Rodríguez y Barrera, 2004). Para realizar esta prueba, no sólo se debe obtener el ADN genómico (previa extracción del material genético de la muestra a analizar), sino que además se emplean otros elementos (algunos de ellos ya citados), como la enzima ADN polimerasa, una pareja de oligonucleótidos o cebadores sintéticos (que normalmente están constituidos por aproximadamente 20 bases) y que deben hibridar específicamente con una región del ADN molde. También se utilizan desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's) y una solución tampón que incluirá cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ). Tras la amplificación, los productos o fragmentos obtenidos pueden visualizarse en geles de agarosa teñidos con colorantes afines al ADN (García, 2010).

Como todas las técnicas de diagnóstico, las moleculares tienen ventajas e inconvenientes. Así, su ventaja más relevante es la alta especificidad y sensibilidad respecto a las técnicas serológicas (Alhassan *et al.*, 2007a; Bhoora *et al.*, 2009). La sensibilidad se define como “la mínima cantidad de ADN que se necesita para llevar a cabo su amplificación” (Orellano, 2018). En nuestro caso, son los límites de detección de un parásito en una serie de células rojas o hematíes. La sensibilidad de una prueba está relacionada con los falsos negativos, de hecho, la fracción de falsos negativos se calcula de la siguiente manera:  $1 - \text{sensibilidad}$  (LaMorte, 2016). En el caso de la PCR, se puede producir un falso negativo cuando la muestra analizada no posee suficiente cantidad de ADN diana para que se produzca su amplificación. La sensibilidad de la PCR es unas 100 veces superior a la de las técnicas microscópicas, pudiendo detectarse ADN del parásito en una sangre con una parasitemia de  $10^{-9}$  (Böse *et al.*, 1995). Esta sensibilidad se traduce en la detección de 1 parásito por cada 1000000000 de eritrocitos. Se obtienen buenos resultados con la PCR incluso cuando la cantidad de ADN a detectar es muy pequeña (1 pg, es decir,  $10^{-12}$  g de ADN) (Böse *et al.*, 1995). Por ello, se puede aplicar con éxito en el diagnóstico de animales crónicos (Böse *et al.*, 1995; Rampersad *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2013b), lo cual resulta muy útil en el caso de la PE. Es cierto que el límite teórico de detección de la PCR depende de diferentes factores como son la mezcla para la prueba, la efectividad de la polimerasa empleada, la presencia o no de inhibidores en la propia muestra o incluso la sensibilidad del equipo de PCR, entre otros (Cha y Thilly, 1993; Pérez de Castro, 2011). En el caso de *Theileria*, la detección del ADN genómico y la sensibilidad se verá influenciada también por la eficiencia en la extracción del ADN, el número de copias del gen por

genoma y el número de parásitos por célula (parasitemia), que varía de un animal a otro, lo cual suele ser superior en caballos de áreas endémicas (Mans *et al.*, 2015).

Con respecto a la especificidad, es un término que hace referencia a la “obtención de un solo producto amplificado” (Orellano, 2018). Ésta depende del protocolo de PCR aplicado y por ello, de factores como la temperatura empleada en la fase de hibridación, la cantidad de iones divalentes y la propia secuencia de los cebadores (Pérez de Castro, 2011). El término especificidad se relaciona con los falsos positivos. De hecho, la fracción de falsos positivos se calcula de la siguiente manera: 1-especificidad (LaMorte, 2016). En el caso de la PCR, una muestra negativa puede diagnosticarse como positiva, debido a que se haya amplificado un fragmento de ADN que no es el ADN diana para el cual se han diseñado los cebadores empleados en la prueba. Con respecto a la especificidad de la PCR, podemos decir que es muy alta, evitándose así las reacciones cruzadas entre *T. equi* y *B. caballi*, de aparición muy frecuente en algunas pruebas serológicas convencionales. La elección de los genes a emplear y el diseño de los cebadores son determinantes en la especificidad y sensibilidad de la prueba (Alhassan *et al.*, 2007b), con objeto de evitar reacciones cruzadas, reduciendo así el número de falsos positivos (Bashiruddin *et al.*, 1999).

Los inconvenientes de esta técnica incluyen entre otros, el tiempo necesario para realizar la prueba, el coste de ésta, el hecho de que algunas veces aparecen falsos positivos por contaminación (Böse *et al.*, 1995), la existencia de sustancias que inhiben la PCR al unirse a la polimerasa o bien al ADN molde, lo que puede originar falsos negativos (Alhassan *et al.*, 2007b), así como el hecho de que el protocolo de la PCR debe de ser muy preciso, siendo en muchos casos más laborioso y complejo que los de otras técnicas tradicionales.

El material biológico problema utilizado para esta prueba se obtiene fundamentalmente de biopsias ganglionares o sangre en el caso de *T. equi* y sangre en el de *B. caballi*.

La técnica PCR convencional se emplea para la detección de estos parásitos (Bashiruddin *et al.*, 1999; Alhassan *et al.*, 2007b), así como otras variantes de esta técnica, entre las que cabe citar la PCR-RLB o Reverse Line Blotting (Gubbels *et al.*, 1999; Nagore *et al.*, 2004; Adaszek *et al.*, 2011); la PCR anidada, también conocida como nested-PCR (Cacciò *et al.*, 2000; Nikolaiewsky *et al.*, 2001; Battsetseg *et al.*,

2001; Rampersad *et al.*, 2003; Baldani *et al.*, 2008); la PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa y análisis del Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) que aplica enzimas de restricción (Cacciò *et al.*, 2000; Nikolaiewsky *et al.*, 2001); la PCR múltiple o mPCR (Alhassan *et al.*, 2005; Rüegg *et al.*, 2007; Lobanov *et al.*, 2018) y la PCR en tiempo real o RT-PCR (Ueti *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2008; Bhoora *et al.*, 2010a; Jaffer *et al.*, 2010; Peckle *et al.*, 2013). Pero incluso existen combinaciones de ellas, como por ejemplo la PCR múltiple en tiempo real ó mRT-PCR (Heim *et al.*, 2007).

Con el desarrollo de todas estas variantes de PCR, se ha perseguido siempre una finalidad, que es aumentar la sensibilidad y especificidad de esta técnica (de Waal, 2012).

#### **2.6.2.3.1.- Principales variantes de la PCR**

A continuación, revisaremos brevemente algunos de estas variantes de PCR que se han empleado en el diagnóstico de las infecciones por *T. equi* y *B. caballi*.

##### PCR y Reverse line Blotting (PCR-RLB)

Es una técnica que combina la PCR y la hibridación con sondas de ADN. Esta técnica se basa en la hibridación de los productos de la PCR con una serie de oligonucleótidos especie-específicos o sondas marcadas con biotina y unidos covalentemente a una membrana de nitrocelulosa (Sparagano y Jongejan, 1999). Posteriormente, se visualizará la unión mediante la quimioluminiscencia, por lo que el producto PCR debe quedar unido a la sonda marcada con biotina. Al aplicarse un conjugado de peroxidasa-estreptavidina, que reaccionará con la biotina, se generará una luz azul que puede ser captada por una película de rayos X, por ello, la muestra que genere luz será considerada como positiva. Las regiones conservadas de los genes permiten el diseño de cebadores comunes a diferentes especies, y las regiones variables facilitan el diseño de sondas altamente específicas que no sólo permiten la diferenciación de especies, sino de variedades o cepas concretas (Medina, 2009; de Waal, 2012).

Esta técnica fue aplicada por vez primera para detectar ADN de *T. equi* en la década de los ochenta (Posnett y Ambrosio, 1989) y para *B. caballi*, a principios de la década de los noventa (Posnett *et al.*, 1991), pudiendo diagnosticarse la enfermedad

tanto en fase aguda como crónica, mostrándose de este modo, como una prueba muy específica y sensible (Figuroa y Buening, 1995). Posteriormente, Sahagun-Ruiz *et al.* (1997) desarrollaron sondas para *B. caballi* marcadas con biotina (con mayor estabilidad y resultados más rápidos) en lugar de las marcadas con radioisótopos (Posnett y Ambrosio, 1991). Esta técnica ha sido aplicada por diferentes autores en estudios epidemiológicos y análisis filogenéticos (Nagore *et al.*, 2004; Bhoora *et al.*, 2009). Se ha usado también para detectar piroplásmidos en garrapatas (Sparagano *et al.*, 2000; Medina, 2009) y para determinar la efectividad de ciertos tratamientos piroplasmicidas (Butler *et al.*, 2008).

Esta prueba tiene una serie de ventajas, como por ejemplo que no se observan reacciones cruzadas (Posnett *et al.*, 1991; Gubbels *et al.*, 1999), que es útil para diagnosticar animales crónicos (Posnett *et al.*, 1991; Nagore *et al.*, 2004) y que permite realizar la detección simultánea de varios agentes patógenos (Gubbels *et al.*, 1999), además de la diferenciación entre diferentes genotipos de estos parásitos (Nagore *et al.*, 2004). Pero también posee desventajas, como, por ejemplo, que es una técnica muy sensible a la calidad de los buffers empleados y la fuerza de la señal se debilita con usos sucesivos de la membrana de nitrocelulosa (Georges *et al.*, 2006).

#### PCR anidada o nested-PCR (nPCR)

Es un tipo de PCR que se realiza en dos fases o rondas de amplificación consecutivas. La primera amplificación emplea unos cebadores extrínsecos o externos (outer) a la región de interés, para amplificar un producto de un determinado tamaño, el producto primario. Posteriormente, los productos obtenidos en esa primera amplificación se emplean como ADN molde y se someten a una segunda amplificación, empleando para ello unos cebadores internos o interiores (inner) que se localizan dentro de los productos PCR amplificados con cebadores externos (outer) utilizados en la primera PCR, de tal manera que se obtiene un producto de tamaño inferior al primero (Dieffenbach *et al.*, 1993; Carr *et al.*, 2010; Wanger *et al.*, 2017). Gracias a esta segunda amplificación se aumenta fundamentalmente la sensibilidad, pero también la especificidad de la técnica. Esto último se debe a que se amplificarían sólo productos más específicos procedentes del material amplificado durante la primera fase y reduciendo así la aparición de fragmentos inespecíficos (Carr *et al.*, 2010; Wanger *et al.*, 2017). Esta técnica es especialmente útil para muestras que no poseen una gran calidad o bien con pocas copias de la secuencia que se quiere amplificar (Dieffenbach *et*

*al.*, 1993), por lo tanto, es interesante su uso y especialmente efectivo para animales crónicos (Baldani *et al.*, 2008). Para *T. equi*, esta técnica es capaz de detectar 6 células infectadas entre  $10^8$  eritrocitos, o lo que es lo mismo, detecta al parásito cuando existe una parasitemia en sangre de 0,000006% (Nikolaiewsky *et al.*, 2001). El hecho de realizar una segunda amplificación permite la detección de más animales enfermos que con una PCR convencional, por lo tanto, la segunda amplificación hace que sea más efectiva la técnica (Rampersad *et al.*, 2003). Cabe citar algunas desventajas de esta prueba como serían la aparición de falsos positivos debido a la contaminación y los mayores costes de ejecución (Leal *et al.*, 2011).

Si comparamos algunos tipos de PCR con la nPCR, como son la PCR convencional y la PCR múltiple (mPCR), podemos decir que estas últimas son más rápidas en el diagnóstico, pero la nPCR es más sensible, incluso cuando hay más riesgo de contaminación de las muestras (Nikolaiewsky *et al.*, 2001; Baldani *et al.*, 2008; Mahdy *et al.*, 2016). Se ha demostrado que esta metodología (nPCR) detecta un 2,29% más de infecciones que la PCR convencional (Rampersad *et al.*, 2003). Esta técnica puede aplicarse perfectamente para estudios filogenéticos, epidemiológicos o seguimiento de animales tratados (Nikolaiewsky *et al.*, 2001), siendo así usada por diferentes autores (Baptista *et al.*, 2013; Ayala-Valdovinos *et al.*, 2014; Braga *et al.*, 2017; Sumbria *et al.*, 2016a; Ayala-Valdovinos *et al.*, 2017).

#### PCR múltiple (mPCR)

En este caso, se detectan fragmentos de diferentes genes de forma simultánea, utilizando varias parejas de cebadores, una para amplificar cada fragmento. En este tipo de PCR deben elegirse cebadores con temperaturas de hibridación similares y las longitudes de los diferentes productos amplificados no deberían diferir demasiado, para evitar amplificaciones desbalanceadas que suelen favorecer a la diana más corta. Por ello, es necesario ajustar experimentalmente los diferentes parámetros de la PCR (concentración de magnesio, cantidad de ADN polimerasa o la cantidad de cebadores empleados, así como su concentración) como indican Méndez-Álvarez y Pérez-Roth (2004).

Si se quiere, incluso estos productos pueden hibridarse con una sonda específica con fines de verificación, aumentando así la sensibilidad y especificidad (Sumbria y Singla, 2015).

La técnica en sí ofrece ciertas desventajas, pues su eficacia podría depender de la presencia de uniones inespecíficas entre los cebadores (dímeros de cebadores) e incluso, de la existencia de una posible discriminación en la amplificación de los fragmentos más largos de ADN (Atlas y Bej, 1994).

Las principales ventajas incluyen el hecho de que es un método que consume menos tiempo que una PCR anidada o la RLB (hibridación), es más barata, y sigue manteniendo una alta sensibilidad y muy buena especificidad (Alhassan *et al.*, 2005).

#### PCR en tiempo real (RT-PCR)

En esta técnica, tanto la amplificación como la detección se producen simultáneamente. Empleando la detección por fluorescencia, se puede medir la cantidad de ADN sintetizado en cada momento de la amplificación, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Así se puede conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para llevar a cabo la RT-PCR incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para medir en cualquier momento la fluorescencia emitida por cada muestra. Los sistemas de detección por fluorescencia suelen ser sondas específicas marcadas con fluorocromos (Heid *et al.*, 1996).

Es una técnica que elimina algunos problemas de contaminación cruzada, además, permite cuantificar fácilmente el ADN del parásito de la muestra analizada (de Waal, 2012). Comparando esta técnica con la nPCR, tendría una sensibilidad y una especificidad del 100% (Kim *et al.*, 2008). Es capaz de detectar cargas parasitarias muy bajas (1,5 parásitos/ $\mu$ l de sangre) y cuantificar el nivel de parásitos en la sangre periférica (Sumbria y Singla, 2015). Otra ventaja es que permite reducir el tiempo empleado en la prueba, ya que se emplean placas de 96 pocillos (Kim *et al.*, 2008). Se considera incluso más sensible que la PCR-RLB (Bhoora *et al.*, 2010a), además de que se reduce el riesgo de contaminación (Mackay, 2004).

Por lo tanto, es una prueba altamente específica y sensible que no sólo se emplea para la detección de parásitos en sangre y su cuantificación (Kim *et al.*, 2008; Jaffer *et al.*, 2010), sino también para realizar estudios epidemiológicos (Peckle *et al.*, 2013) y para la detección de estos protozoos en garrapatas (Ueti *et al.*, 2003).

### PCR múltiple en tiempo real (mRT-PCR)

Como su propio nombre indica, consiste en realizar una PCR en tiempo real, pero empleando primers para un parásito y otro, simultáneamente. Tiene las ventajas de una RT-PCR y además permite distinguir si la parasitación es mixta o individual. Así, Heim *et al.* (2007), emplean primers para el gen *EMA-1* diseñados por Ueti *et al.* (2003) y primers para el gen *RAP-1* diseñados por ellos mismos.

### Amplificación isotérmica de forma cíclica (LAMP)

Es un método que permite la amplificación de ADN de forma rápida (puede llegar a crear  $10^9$  copias de ADN en menos de una hora) y se produce en condiciones isotérmicas (a temperaturas de 60-65°) y sin la necesidad de emplear termocicladores. La ADN polimerasa que se utiliza no sólo polimeriza, sino que tiene una alta capacidad de desplazamiento de la cadena de ADN. Es necesario emplear un juego de cuatro cebadores que incluye una pareja de oligonucleótidos externos (outer) y otra de cebadores internos (inner). Este juego de cuatro oligonucleótidos reconoce un total de seis secuencias en el ADN diana. Cada cebador interno posee dos secuencias distintas que corresponden a las secuencias sentido y antisentido del ADN blanco, una para cebar en la primera etapa y otra para auto-cebarse en etapas posteriores. En el primer paso de la técnica se emplean los cuatro oligonucleótidos, pero tras completarse el primer ciclo, sólo se usan los cebadores internos para la síntesis del ADN. El uso de los cebadores internos así diseñados, permite la formación de un bucle (loop) de ADN que será la base para la segunda fase de amplificación de la técnica LAMP. Los productos se visualizan en un gel de agarosa como sucede con otros tipos de PCR. Parece que esta prueba posee una alta sensibilidad y especificidad (Notomi *et al.*, 2000; Arroyo *et al.*, 2008).

Alhassan *et al.* (2007a) han empleado esta técnica para la detección de *T. equi* y *B. caballi* usando los genes *EMA-1* y *RAP-1*, y han indicado que podría ser una prueba alternativa para la PCR estándar. Alhassan *et al.* (2007c) también demostraron que posee mayor sensibilidad y especificidad que la PCR, debido al uso de un mayor número de cebadores, que poseen 6 dianas en el ADN que se desea amplificar. Esta técnica podría utilizarse en países que contasen con pocos recursos por su simplicidad.

Xie *et al.* (2013) sostienen que es una prueba muy específica que podría aplicarse a la detección de piroplásmidos en garrapatas y que posee una muy buena sensibilidad, pudiendo detectar 10pg/μl de ADN de *T. equi*.

### PCR y análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP)

Tras la obtención por amplificación de los productos PCR, el ADN se puede cortar en diferentes fragmentos empleando los lugares específicos para las dianas de las endonucleasas de restricción de tipo II, lo cual tiene su uso como marcadores genéticos (sitios de restricción). Las endonucleasas de restricción reconocen una secuencia diana específica en la hebra de ADN, de forma que la escinden en fragmentos más cortos cuando encuentran tales dianas. Dichos fragmentos se separarán fácilmente por su tamaño molecular mediante una electroforesis en geles de agarosa o bien mediante electroforesis capilar. De esta forma, se puede observar un patrón polimórfico basado en las diferencias de los tamaños moleculares resultantes, conocido también como mapa de restricción (Calero, 2011), que tiene diferentes aplicaciones. Entre ellas se incluyen la de diferenciar distintas cepas de una misma especie o distinguir diferentes especies de protozoos, como sucede con las Babesias y Theilerias (Cacciò *et al.*, 2000).

La ventaja más destacable de esta técnica es que puede emplearse con ADN que se encuentre muy degradado. Tendría dos inconvenientes fundamentales, el tiempo necesario para desarrollar la prueba y el hecho de que necesita una gran cantidad de ADN purificado para llevarse a cabo (Bretagne *et al.*, 1997).

#### **2.6.2.3.2.- Principales genes empleados en el diagnóstico molecular de la Piroplasmosis Equina**

Para realizar una PCR se debe amplificar un fragmento de ADN procedente de alguno de los genes presentes en el genoma del parásito. Así, los genes más empleados para el diagnóstico de la PE son: *18S rRNA* y *RAP-1* para *B. caballi* y para *T. equi*: *18S rRNA*, *EMA-1* y *EMA-2*. Aunque no son los únicos utilizados, como expondremos a continuación.

##### **Gen *18S rRNA***

Este gen (gen de la subunidad menor del ribosoma) está situado en el cromosoma 1 de *T. equi* (Kappmeyer *et al.*, 2012) y muestra una secuencia altamente conservada (siendo análoga al gen 16S de los procariontes). Pero pese a ser un gen muy conservado, presenta regiones de su secuencia genéticamente variable. Así, se pueden

encontrar 9 segmentos altamente variables (V1-V9), siendo la región V4 la más variable de todas en los eucariotas y una de las más recomendadas para el diseño de cebadores que permitan el estudio de la diversidad en las diferentes especies (Hadziavdic *et al.*, 2014). Es, por ello, uno de los genes más empleados en clasificación taxonómica y análisis filogenéticos (Salim *et al.*, 2010). Tanto es así, que el análisis de la secuencia genética del gen *18S rRNA* permitió la reclasificación de *B. equi* en *T. equi* (Mehlhorn y Schein, 1998; Laha *et al.*, 2015). Las zonas cercanas a las terminaciones 3' y 5' de su secuencia permiten el diseño de oligonucleótidos bastante adecuados para la PCR (Allsopp y Allsopp, 2006). Ha sido y es uno de los genes más empleados para PCR, como muestran diversos estudios realizados por diferentes autores. Por ello, se ha empleado tanto para estudios filogenéticos como para el diagnóstico de *B. caballii* (Nagore *et al.*, 2004; Alhassan *et al.*, 2005; Fritz, 2010; Kouam *et al.*, 2010b; Butler *et al.*, 2012; Gallusová *et al.*, 2014) y de *T. equi* (Criado-Fornelio *et al.*, 2003; Alhassan *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008; Salim *et al.*, 2008; Fritz, 2010; Sloboda *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2011; Ibrahim *et al.*, 2011; Butler *et al.*, 2012; Laus *et al.*, 2013; Qablan *et al.*, 2013; Alanazi *et al.*, 2014; Abedi *et al.*, 2014).

### **Familia de genes *EMA***

En relación a los genes de la familia *EMA*, se sabe que incluye 10 genes distintos situados en los cromosomas 1, 2 y 4 del parásito *T. equi*. Esta familia de genes codifica proteínas de superficie y, precisamente, debido a esta localización estarían sometidas a una intensa presión de selección. Por ello, resulta lógico pensar que las secuencias de los genes que las codifican posean gran heterogeneidad molecular (Allsopp y Allsopp, 2006). De todos los genes que forman parte de esta familia, los más estudiados y empleados son los genes *EMA-1*, *EMA-2* y *EMA-3*.

El gen *EMA-1*, descrito como un gen de copia única (Kappmeyer *et al.*, 1993; Knowles *et al.*, 1997), codifica una proteína de 34 kDa situada en la superficie del merozoíto (Kappmeyer *et al.*, 1993; Knowles *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2004). Esta proteína parece ser que está conservada entre especies de *Theilerias* (Kappmeyer *et al.*, 1993) y se expresa sobre todo cuando el parásito está en la sangre del hospedador (Kappmeyer *et al.*, 2012). Además, este gen se expresaría conjuntamente con el gen *EMA-2* en la superficie del merozoíto cuando éste se encuentra fuera del glóbulo rojo. En cambio, no se expresaría durante todas las fases asexuales del desarrollo del

merozoíto en el interior del eritrocito, sólo en las fases más tempranas (Kumar *et al.*, 2004).

La proteína codificada por el gen *EMA-1* se emplea en el test cELISA como antígeno recombinante (Knowles *et al.*, 1991b). Esta prueba ha sido usada por diversos autores (Sevinc *et al.*, 2008; Bhoora *et al.*, 2010b; Jaffer *et al.*, 2010; Kouam *et al.*, 2010; Abutarbush *et al.*, 2011; Mujica *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2011; García-Bocanegra *et al.*, 2013; Rosales *et al.*, 2013; Posada-Guzmán *et al.*, 2015; Mahmoud *et al.*, 2016; Camino *et al.*, 2018; Lobanov *et al.*, 2018). Pero esta proteína no sólo se emplea para el cELISA comercial, ya que otros investigadores la usan en protocolos, para cELISA, creados por ellos mismos (Baldani *et al.*, 2011).

La secuencia genética de este gen también se ha usado para realizar el diseño de cebadores de PCR (Nikolaiewsky *et al.*, 2001; Battsetseg *et al.*, 2001; Alhassan *et al.*, 2005; Alhassan *et al.*, 2007b; Salim *et al.*, 2008; Motloang *et al.*, 2008; Baptista *et al.*, 2013). Según Bhoora *et al.* (2010a), su uso incrementaría la sensibilidad y especificidad de la PCR, mejorando la detección y diagnóstico de *T. equi*.

El gen *EMA-2*, un gen de copia única, al igual que el gen *EMA-1*. Codifica la expresión de una proteína de 30kDa (Knowles *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2004), que comparte una identidad del 52% en sus aminoácidos con la proteína *EMA-1* (*et al.*, 1997). Sin embargo, los antígenos producidos por uno y otro gen no muestran una reacción cruzada (Kumar *et al.*, 2004). El gen *EMA-2* se expresa principalmente cuando el parásito se encuentra en las glándulas salivares de la garrapata (Kappmeyer *et al.*, 2012). Y parece que este gen podría ser también el responsable de la unión que se produce entre los glóbulos rojos parasitados (Kumar *et al.*, 2004), alterando las proteínas del citoesqueleto del eritrocito y de la membrana, para así favorecer la adherencia entre estas células (Kumar *et al.*, 2012) y el paso del parásito de un eritrocito a otro, aunque este hecho no está plenamente demostrado (Ikadai *et al.*, 2006).

El antígeno que produce el gen *EMA-2* se ha empleado para el desarrollo de protocolos ELISA (Wang *et al.*, 2014; Kamyngkird *et al.*, 2014) y su secuencia genética para el diseño de cebadores de PCR (Alhassan *et al.*, 2007b; Alhassan *et al.*, 2007c).

Otro de los genes de la familia es el gen *EMA-3*. Se trata de un gen sin intrones, y la proteína que expresa aparece en la superficie del parásito y en el citoplasma o en la

membrana del eritrocito parasitado. Pero es verdad que aún no se conoce realmente la función de este gen y, por lo tanto, de las proteínas que expresa. Parece ser que su papel estaría relacionado con la supervivencia y la replicación de *T. equi* dentro de los hematíes (Ikadai *et al.*, 2006).

### **Gen *RAP-1* ó *BC48***

Otro de los genes más conocidos es el gen *RAP-1* ó *BC48*, que codifica la Proteína-1 asociada a la roptra del parásito (Kappmeyer *et al.*, 1999). Parece que este gen se sitúa en el cromosoma 3 de *B. caballi* (Ikadai *et al.*, 2004), es multicopia y no posee intrones (Ikadai *et al.*, 1999). La proteína codificada por dicho gen tendría 48 kDa (Heim *et al.*, 2007). Esta familia de genes se encuentra en diferentes especies del género *Babesia*, que como nos indican Dalrymple *et al.* (1996), pueden distinguirse por el tamaño del producto amplificado tras realizar una PCR. Estos genes parecen jugar un papel esencial en la invasión y expansión en las células del hospedador por parte del parásito (Sam-Yellowe, 1996). Parece que las proteínas codificadas por los genes que forman parte de la familia *RAP-1* son una de las dianas de unión de los anticuerpos que inhiben e intentan evitar la invasión de los merozoítos (Ikadai *et al.*, 1999; Yokoyama *et al.*, 2006). Por lo tanto, jugarían un papel muy importante en la respuesta inmune de los hospedadores vertebrados (Suarez *et al.*, 2003). Podría ser uno de los genes más apropiados para la producción de vacunas contra *B. caballi* (Ikadai *et al.*, 1999). Se ha empleado en diagnósticos mediante PCR (Alhassan *et al.*, 2005; Alhassan *et al.*, 2007c; Heim *et al.*, 2007; Salim *et al.*, 2008; Motloang *et al.*, 2008; Bhoora *et al.*, 2010b; Rapoport *et al.*, 2014) e incluso para la creación de diferentes protocolos de ELISA (Ikadai *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2014; Kamyngkird *et al.*, 2014) entre los que hay que destacar el cELISA (Kappmeyer *et al.*, 1999).

Otros genes menos empleados en el diagnóstico de los hemoparásitos *B. caballi* y *T. equi* son el gen de la  $\beta$ -tubulina y el gen *Be82* (*Te82*):

### **Gen de la $\beta$ -tubulina**

Es un gen altamente conservado (Cacciò *et al.*, 2000) que puede ser empleado en la detección molecular de los piroplásmidos, aunque es muy poca la información molecular disponible referida a *B. caballi* y *T. equi*. Es uno de los pocos genes de los Apicomplexa que posee uno o varios intrones (Cacciò *et al.*, 2000; Zamoto *et al.*, 2004).

Parece ser que la posición del primer intrón está conservada en todas las especies, lo que facilita el diseño de los primers en esta zona. Además, este intrón difiere en tamaño y secuencia entre especies, lo que tiene gran utilidad para el diseño de protocolos PCR específicos de especie, pudiéndose diferenciar los piroplásmidos de distintas especies, bien sea por el tamaño del producto PCR amplificado o a través del uso de enzimas de restricción en PCR-RFLP (Cacciò *et al.*, 2000). De hecho, estos autores consiguen distinguir entre *T. equi* y *B. caballi* por la diferencia existente en la longitud del producto amplificado (menor en el caso de *T. equi* y mayor en el caso de *B. caballi*). De esta manera, a través de una sola prueba, como es la nPCR, y sin necesidad de emplear oligonucleótidos específicos para cada hemoparásito, sino cebadores que co-amplifican ambas especies, se pueden identificar los dos parásitos (lo que es especialmente interesante en el caso de infecciones mixtas).

Aunque algo más desconocido, también encontramos el **gen *Be82*** (*Te82*) de *T. equi* (Alhassan *et al.*, 2007b). Sin embargo, y como demuestran estos autores, parece dar peores resultados a la hora de utilizarlo con fines diagnósticos, pues los primers diseñados a partir de su secuencia detectaron menos animales positivos en dicho estudio que empleando cebadores para genes como el *18S rRNA*, el *EMA-1* o el *EMA-2*, resultado que podría justificarse porque este gen es muy desconocido y podría tener gran variabilidad genética.

### **2.6.3.- Diagnóstico parasitológico indirecto**

Existen diferentes métodos de diagnóstico serológico, es decir, indirectos para la detección de anticuerpos frente a los piroplásmidos. Los más utilizados son la prueba IFI y la ELISA.

Los métodos indirectos son los de elección para la detección de portadores crónicos, utilizados especialmente cuando los animales son destinados a la exportación o importación. Las pruebas recomendadas para este fin en el manual de pruebas de diagnóstico y vacunas para los animales terrestres de la OIE, son la prueba ELISA y la técnica IFI, mientras que la Fijación de Complemento (RFC) se considera como una prueba de sustitución para las anteriores (OIE, 2014).

A continuación, pasamos a describir brevemente las técnicas más utilizadas en el diagnóstico serológico de la PE:

### 2.6.3.1.- Reacción de Fijación de Complemento (RFC)

Esta prueba fue la primera utilizada para la detección de anticuerpos frente a *Babesia*, pues ya Hirato *et al.* (1945) y Frerichs *et al.* (1969), demostraron la presencia de anticuerpos frente a *B. caballi*. También Dennig (1966) detectó anticuerpos frente a *T. equi* con esta misma técnica. Tanto Holbrook *et al.*, (1972) como Stepanova y Petrovskii (1975) determinaron que era una técnica apropiada para el diagnóstico de la PE. Éste fue el primer método usado por algunos países como EEUU, para testar los équidos importados y determinar, en función de los resultados, si eran o no aptos para entrar en dicho país (Taylor *et al.*, 1969).

Consiste en la detección indirecta de anticuerpos (Ac) que puedan existir en el suero de los animales estudiados. Se emplean diferentes diluciones del suero problema (que oscilan normalmente entre 1:5 y 1:1280), las cuales se enfrentan al antígeno (Ag) bien de *B. caballi* o de *T. equi*, formándose así un inmunocomplejo (unión Ag-Ac), el cual activa el complemento, que se unirá a él. Se necesita además un sistema indicador (de tipo hemolítico) para detectar el complemento si éste no se ha unido a los inmunocomplejos. Para este fin, se usan los eritrocitos de una especie distinta, como por ejemplo de ovino. De esta manera, si hay complemento libre que no se fijó en la reacción, se lisarán las membranas celulares de los eritrocitos, indicando así que no hay Ac en el suero problema. Se considera positiva la dilución 1:5 (Bier *et al.*, 1968; Brüning, 1996; Baldani *et al.*, 2007).

La fijación de complemento es considerada como una prueba muy específica para el diagnóstico de la piroplasmosis que puede detectar anticuerpos a partir del octavo día postinfección (Brüning, 1996), pero su principal inconveniente es la baja sensibilidad en comparación con la IFI (Donnelly *et al.*, 1980a; Soulé *et al.*, 1984; Tenter, 1986; Weiland, 1986; Tenter y Friedhoff, 1986; Heuchert *et al.*, 1999), mostrando esta última títulos mayores de anticuerpos que los obtenidos por la RFC (Donnelly *et al.*, 1980b; Kuttler *et al.*, 1988a). Esta técnica no sólo tiene menos sensibilidad que la prueba IFI, sino también menos que el test ELISA (Böse y Peymann, 1994; Kumar *et al.*, 1997) o que la técnica PCR (Bashiruddin *et al.*, 1999). Otros autores, en cambio, asemejan los resultados de sensibilidad y especificidad de la RFC a los obtenidos por IFI o ELISA (Baldani *et al.*, 2007).

La RFC posee otros inconvenientes como, por ejemplo, las reacciones cruzadas entre los antígenos de ambos hemoparásitos e incluso la aparición de falsos positivos (Donnelly *et al.*, 1980a, 1982; Friedhoff, 1982; Tenter y Friedhoff, 1986; Brüning, 1996). En ciertas ocasiones, no es capaz de detectar todos los animales infectados (especialmente aquellos que han sido tratados) como nos indican Kuttler *et al.*, (1988a), dándose, por lo tanto, numerosos falsos negativos sobre todo en casos crónicos (Knowles *et al.*, 1992). La prueba RFC se basa en que las inmunoglobulinas fijan el complemento, siendo las inmunoglobulinas IgG3 las que poseen esta capacidad, pero no las IgG5 (antes IgGT), prevalenciando esta últimas en el suero mucho más tiempo que las IgG3, que desaparecerían más rápidamente. Este fenómeno explicaría que la reacción de fijación de complemento no sea tan efectiva en ciertos casos, como por ejemplo sucede con los animales crónicos (McGuire *et al.*, 1971). Weiland (1986) señala que la RFC detecta un tipo de anticuerpo que desciende en el suero de una manera más rápida en el caso de *B. caballi* que para *T. equi*, y por ello, ciertos animales resultan seropositivos frente a *B. caballi* hasta 13 meses o más postinfección, pero animales infectados con *T. equi* muestran dichos anticuerpos hasta 24 meses o más después de ser infectados (Donnelly *et al.*, 1980b; Joyner *et al.*, 1981; Friedhoff, 1982; Weiland *et al.*, 1984).

Esta metodología no se recomienda para evaluar resultados de vacunaciones o tratamientos (Musoke *et al.*, 1997). La RFC presenta otros inconvenientes, ya que se necesita gran cantidad de antígeno preparado a partir de sangre de caballos infectados, siendo además cara y laboriosa (Brüning, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997).

Debido a todos estos inconvenientes, hoy en día es una técnica que apenas se está empleando para el diagnóstico o para realizar estudios epidemiológicos.

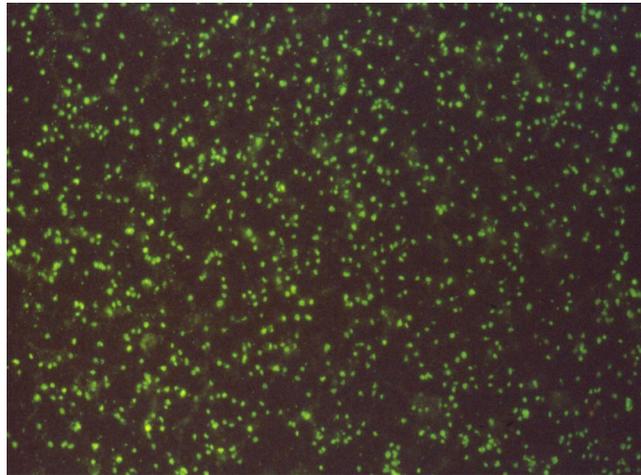
### **2.6.3.2.- Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)**

Esta técnica se aplica para la detección de Babesias y Theilerias prácticamente en todas las especies animales e incluso en humana.

Básicamente, consiste en la detección en suero de los anticuerpos específicos, de tal manera que el antígeno (merozoítos intraeritrocitarios) se fija a un portaobjetos y ambos (suero y antígeno) se enfrentarán, formándose en caso de seropositividad inmunocomplejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). Posteriormente, se añadirán

antiinmunoglobulinas marcadas con un fluorocromo que suele ser isotiacianato de fluoresceína, que se unirá al complejo Ag-Ac, visualizándose el resultado al microscopio de epifluorescencia (De Vos y Jorgensen, 1991). Se emplean diluciones de los sueros que oscilan entre 1:80 y 1:1280. Un título igual o superior a 1:80 se considera positivo (Brüning, 1996). Normalmente, el antígeno suele obtenerse de caballos infectados y esplenectomizados, con parasitemias que rondan el 3% o son incluso superiores (Camacho *et al.*, 2005).

Esta prueba se empleó por primera vez en 1964 (Ristic *et al.*, 1964; Ristic y Sibinovic, 1964) para el diagnóstico de la PE y se ha utilizado desde hace décadas para el diagnóstico diferencial entre *T. equi* y *B. caballi*, pues Madden y Holbrook en 1968 determinaron que era una prueba especie-específica. Los anticuerpos producidos por el animal son detectados unos 3-20 días tras la infección (Weiland, 1986) y pueden ser detectados por IFI durante largos períodos de tiempo. En el caso de *T. equi*, el animal será portador prácticamente de por vida y los anticuerpos persistirán, aunque los títulos descendan. En el caso de *B. caballi*, el parásito puede desaparecer del torrente circulatorio del individuo y los anticuerpos detectables por los métodos serológicos convencionales, por lo tanto, también.



**FIGURA 8:** Seropositividad a *T. equi* por Inmunofluorescencia Indirecta (Dilución 1:1280)

La técnica IFI permite el diagnóstico de piroplasmosis agudas y crónicas, resultando especialmente útil para la detección de portadores crónicos, realización de estudios seroepidemiológicos y ensayos de inmunización, pues tiene una alta sensibilidad al detectar anticuerpos de larga duración (Ristic *et al.*, 1964; Kuttler *et al.*, 1986; de Waal *et al.*, 1988). Para Rosales (1989), esta prueba no sólo sería básica para emplearla en los programas de vigilancia epidemiológica, sino para programas de control o erradicación de la PE.

Es un método diagnóstico más sensible que la observación microscópica de extensiones de sangre (Olsen y Steven, 1983) y más específica y sensible que la prueba

RFC (Brüning, 1996; Heuchert *et al.*, 1999). Otros indican que su especificidad es similar a la de la RFC, aunque su sensibilidad es mayor (Huang *et al.*, 2006a; Ogunremi *et al.*, 2007, 2008). Algunos autores han determinado que es una prueba menos sensible y específica que el test ELISA (Knowles *et al.*, 1991b; Kumar *et al.*, 2003).

Posee ciertos inconvenientes, pues pueden darse reacciones cruzadas (Tenter y Friedhoff, 1986; Weiland, 1986; Böse y Peymann, 1994) e incluso algún falso positivo (Heuchert *et al.*, 1999; Xuan *et al.*, 2001a). Una reacción positiva fuerte se reconoce fácilmente, pero resulta más complicado diferenciar un positivo débil de un negativo, por ello, se requiere gran experiencia de lectura. Además, el resultado puede verse influenciado por el juicio subjetivo de quien realiza la lectura (OIE, 2014) o por la fatiga que genera la observación microscópica (Böse *et al.*, 1995).

Pese a estos inconvenientes, es una prueba recomendada por la OIE para la detección de esta enfermedad (OIE, 2014).

### **2.6.3.3.- Técnica inmunoenzimática (ELISA)**

Esta prueba diagnóstica se basa en la detección de la unión antígeno-anticuerpo (complejo Ag-Ac) mediante la medición de la reacción colorimétrica producida por la actividad de una enzima sobre su substrato específico unido a dicho complejo Ag-Ac. Esta técnica puede ser empleada para detectar y cuantificar la presencia de antígenos (métodos directos) o la de anticuerpos (métodos indirectos) (Quintero-Ronderos *et al.*, 2013).

La técnica ELISA fue probada por primera vez para el diagnóstico de la PE por Gotz (1982), mostrando una mayor sensibilidad comparada con la RFC, detectando anticuerpos incluso 2 días post infección (Brüning, 1996). Sin embargo, esta técnica era poco específica, pues aparecían reacciones cruzadas y así lo demostraron distintos estudios (Gotz, 1982; Merkle, 1983; Weiland, 1986; Böse y Peymann, 1994; Böse *et al.*, 1995; Brüning, 1996). Esta baja especificidad se debía al uso de antígeno preparado a partir de lisados de eritrocitos infectados (antígeno somático), lo que produjo además otros problemas, pues se debía obtener una gran cantidad de antígeno obtenido a partir de sangre con una elevada parasitemia y, en consecuencia, gran cantidad de glóbulos rojos del hospedador. Esto generaba por un lado una intensa reacción de fondo en las placas de ELISA y, por otro, la existencia de las reacciones cruzadas ya mencionadas. A pesar de ello, algunos investigadores han seguido usando este método de obtención de

antígeno, es decir, a partir de lisados de eritrocitos infectados (Baldani *et al.*, 2004; Braga *et al.*, 2017).

Zwart y Brocklesby (1979) indicaron que la manera de preparar el antígeno de *Babesia* era muy importante y afectaba a la especificidad y, por tanto, podía originar la aparición de reacciones cruzadas. Por ello, y debido a la existencia de estos problemas, comenzó a producirse antígeno mediante la técnica del ADN recombinante, que posee las siguientes ventajas: dicho antígeno no posee proteínas procedentes del hospedador, su fabricación es relativamente barata y es mínima la variación existente entre un lote y otro de antígeno, por lo que es un producto muy homogéneo (Böse *et al.*, 1995). De este modo, se evitan las reacciones cruzadas (Sugimoto *et al.*, 1998) y no se emplean animales infectados para su producción, permitiéndonos tener una fuente constante de antígeno (OIE, 2014).

Los antígenos usados para la fabricación de las proteínas tenían que ser especie-específicos para elevar la especificidad de la prueba, además de que debían ser comunes y estar conservados entre las cepas de diferentes puntos geográficos. De esta manera, se detectaron diferentes proteínas de *B. caballi*, con un peso molecular entre 30 y 141 kDa, que podían ser útiles en su diagnóstico. Se constató que las proteínas de 48 y 50 kDa eran adecuadas para pruebas inmunodiagnósticas y las de peso molecular de 49 y 70 kDa, producidas por los merozoítos de *B. caballi*, eran muy inmunogénicas y específicas y, por tanto, ideales para los ELISA indirectos (Brüning, 1996).

Para *T. equi* también se estudió la existencia de estas proteínas especie-específicas, descubriéndose una serie de ellas gracias a las investigaciones de diferentes autores (Knowles *et al.*, 1991a; Ali *et al.*, 1993; Böse y Hentrich, 1994). De este modo, la proteína con un peso molecular de 34 kDa, sintetizada a partir del gen *EMA-1*, se mostraba como una de las más idóneas para realizar la ELISA, pues era reconocida por anticuerpos presentes en el suero de caballos infectados natural y experimentalmente en diferentes países. Parecía ser idónea para emplearse como antígeno para el ELISA indirecto (Brüning, 1996). Baldani *et al.* (2011) también determinaron que la proteína de 34 kDa expresada por este gen parecía ser muy adecuada para el serodiagnóstico de este parásito.

A principios de la década de los años noventa del siglo XX, Knowles *et al.* (1991a, 1991b) diseñaron una prueba cELISA (competitive enzyme-linked immunosorbent assay) para el diagnóstico de *T. equi* utilizando anticuerpos monoclonales. En esta variante de la técnica ELISA, los anticuerpos del suero problema

debían competir con los anticuerpos monoclonales específicos (diseñados en laboratorio) para unirse al antígeno (proteína expresada por el gen *EMA-1*). Posteriormente, esta prueba fue optimizada (Knowles *et al.*, 1992) empleando proteínas recombinantes producidas igualmente a partir del gen *EMA-1*. La validación de esta técnica se realizó comparando los resultados de muestras testadas por la cELISA y por la IFI. Así, se demostró la existencia de una concordancia entre ambas técnicas del 95,7% en muestras procedentes de Israel (Shkap *et al.*, 1998) y del 91% en muestras de Marruecos (Rhalem *et al.*, 2.001).

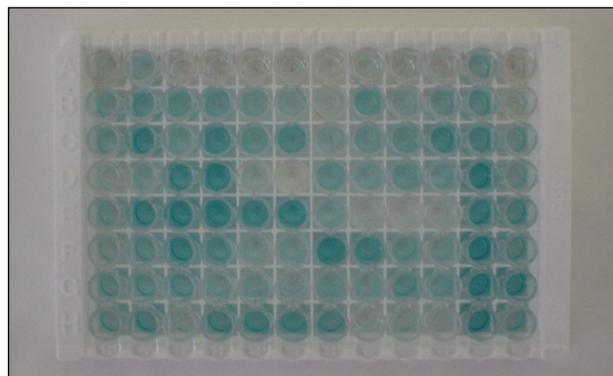
También se trató de estandarizar esta prueba (cELISA) para el diagnóstico de *B. caballi*, empleando igualmente anticuerpos monoclonales (que parecían ser apropiados para la detección de este parásito, como ya probaron Brüning *et al.* en 1997) y usando como antígeno proteínas recombinantes expresadas por el gen *RAP-1*, demostrándose así una mayor especificidad y sensibilidad (Kappmeyer *et al.*, 1999).

Según algunos estudios, la técnica ELISA competitiva ha demostrado tener una mayor especificidad que la IFI o la ELISA indirecta (Knowles *et al.*, 1991b, 1992; Shkap *et al.*, 1998; Kappmeyer *et al.*, 1999; Katz *et al.*, 2000; Xuan *et al.*, 2002).

Otros autores han diseñado protocolos distintos, por ejemplo, Böse *et al.* (1994), estandarizaron un ELISA no competitivo para *B. caballi* que posteriormente modificaron ligeramente (Böse y Peymann, 1994). Parece que esta prueba funcionaba bastante bien al emplear antígenos de 48 kDa y 50 kDa, aunque el antígeno utilizado era crudo y provocaba reacciones cruzadas. Ikadai *et al.* (2000) trabajaron con una técnica ELISA que empleaba una proteína recombinante de 48 kilodalton de las roptrias de *B. caballi*, obtenida con un vector de expresión, el pGEX4T, en *E. coli*.

Xuan *et al.* (2001b), desarrollan otro protocolo de trabajo con el gen *EMA-1* tras la obtención de proteínas mediante un baculovirus.

El gen *EMA-1* es de los más conocidos, pero el gen *EMA-2* también se utiliza, pues codifica una proteína que puede emplearse fácilmente en la realización de pruebas ELISA, como lo confirmaron Tanaka *et al.* (1999), Huang *et al.* (2003) y Kumar *et al.* (2013).



**FIGURA 9:** Placa de cELISA lista para la lectura cromatográfica

Esta técnica también fue desarrollada usando la proteína codificada por el gen Be82 (Hirata *et al.*, 2002), clonada en *E. coli*, de tal manera que la proteína de 82kDa obtenida sería un antígeno específico de *T. equi*. Estos autores mejoraron su protocolo en 2003, para evitar la existencia de reacciones cruzadas con *B. caballi* (Hirata *et al.*, 2003).

La técnica ELISA es bastante sensible y económica, también más específica que la RFC y posee una mayor sensibilidad en el diagnóstico de animales infectados (Brüning, 1996), detectando seropositividad tan pronto o antes que la fijación de complemento (OIE, 2014).

Posee ciertas ventajas con respecto a la prueba IFI. En primer lugar, la objetividad del diagnóstico, pues se realiza a través de colorímetro y permite automatización. En consecuencia, se puede procesar un mayor número de muestras (Böse *et al.*, 1995). Cuando se emplean antígenos recombinantes, éstos son más fáciles de almacenar, cultivar, extraer o purificar que los antígenos empleados en la IFI (Huang *et al.*, 2006a). La eficacia de expresión de los antígenos, sobre todo en *E. coli* (aunque también se puede emplear baculovirus como lo hacen Tanaka *et al.*, 1999 y Xuan *et al.*, 2001b), permite que la prueba sea más económica y factible para la producción a gran escala de antígeno y una posterior comercialización, permitiendo de este modo, una estandarización en el diagnóstico de ambos hemoparásitos (Huang *et al.*, 2006a). Es una metodología más o menos barata, que permite el diagnóstico de gran número de muestras y es apta para emplear donde la infraestructura para la realización de pruebas moleculares no existe (Mans *et al.*, 2015).

Algunos autores consideran que esta metodología presenta una sensibilidad comparable con la de IFI y resulta útil para el diagnóstico de casos clínicos y caballos asintomáticos (Salim *et al.*, 2008; Jaffer *et al.*, 2010). Esta técnica se ha convertido en una de las recomendadas por la OIE para permitir el movimiento de los équidos de un país a otro, incluso podría reemplazar a la IFI (OIE, 2014). Actualmente, se está empleando con frecuencia para realizar chequeos seroepidemiológicos, ya que ha demostrado ser efectiva en diferentes puntos de la geografía mundial (Kappmeyer *et al.*, 1999; García-Bocanegra *et al.*, 2013; Sevinc *et al.*, 2008; Jaffer *et al.*, 2010; Kouam *et al.*, 2010a; Abutarbush *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2011; Rosales *et al.*, 2013; Rapoport *et al.*, 2014). Según estudios de Knowles *et al.* (1997), el grado de diversidad entre los genes *EMA-1* de diferentes cepas (provenientes de Marruecos, Brasil y Florida) sería

muy bajo, optándose por dicho gen para diseñar el cELISA. Además, los niveles de anticuerpos específicos producidos por los animales frente a las proteínas expresadas por los genes *EMA* son muy altos, facilitando de este modo el diagnóstico. Todo ello viene sustentado por los resultados obtenidos por Xuan *et al.* (2001b), quienes confirman la alta homología encontrada entre 19 cepas procedentes de diferentes países.

Sin embargo, otros estudios indicaron que esta técnica (cELISA) no es totalmente fiable en el diagnóstico de *B. caballi*. Autores como Bhoora *et al.* (2010b) y Rapoport *et al.* (2014), han demostrado la poca eficacia que posee para detectar cepas sudafricanas e israelíes, respectivamente. El argumento de estos autores se fundamenta en la heterogeneidad en el gen *RAP-1* en el cual se basa esta prueba serológica.

#### **2.6.3.4.- Test de Aglutinación en Látex (LAT)**

Hoy en día, esta prueba se está empleando para la detección de *T. equi* utilizando antígenos recombinantes de merozoítos de este parásito, en concreto el *EMA-1*. Este antígeno se fija a partículas de látex y cuando el suero es positivo se produce la aglutinación. Se enfrentan al antígeno una serie de diluciones del suero problema, desde 1:4 hasta 1:128, considerándose positivo cuando la aglutinación se observa a simple vista en la dilución 1:4 o superior. La reacción se lleva a cabo sobre portaobjetos (Xuan *et al.*, 2001a).

Según Xuan *et al.* (2001a), este método es una alternativa simple, rápida, sensible, específica y no más cara que las técnicas IFI o ELISA para la detección de anticuerpos frente a *T. equi*. Este test parece que puede ser usado con éxito en situaciones en las que el tiempo, el equipamiento y la tecnología requerida para un IFI o un ELISA no están disponibles.

Sus resultados son muy similares a los obtenidos empleando las pruebas anteriormente citadas, siendo incluso en algunas ocasiones más fiables.

#### **2.6.3.5.- Western blot o Inmunoblot (WB)**

Es un método que permite la separación y aislamiento de proteínas específicas del agente causal de la enfermedad, que servirán para detectar anticuerpos presentes en un suero problema. Las proteínas (antígenos) se separan mediante una electroforesis empleando geles de poliacrilamida. Posteriormente, se produce una transferencia de

dichas proteínas a un soporte sólido, que suele ser una membrana de nitrocelulosa y se enfrentan a los sueros problema, pudiendo producirse la unión entre el antígeno y los anticuerpos. El complejo antígeno-anticuerpo se podrá evidenciar por actividad enzimática o incluso por fluorescencia (UBA, 2010). Böse y Daemen (1992) y Samuel *et al.* (1999) fueron de los primeros autores que aplicaron esta técnica a la detección de *B. caballi* y *T. equi*, respectivamente.

Es una técnica muy específica, incluso más que la ELISA (Böse y Daemen, 1992), que se puede aplicar para el diagnóstico de la PE (Böse y Peymann, 1994), siendo especialmente válida para determinar qué antígenos muy conservados son útiles para emplearlos en la detección de la infección (Böse *et al.*, 1994). Por ello, sirve de ayuda para el desarrollo de ciertas pruebas diagnósticas como por ejemplo la técnica ELISA. Entre los autores que emplean el WB para el desarrollo de técnicas diagnósticas para piroplásmidos, encontramos a Brüning *et al.* (1997), Huang *et al.* (2003) y Baldani *et al.* (2011).

Es una prueba más específica que la cELISA y la RFC cuando se intenta determinar la respuesta a un tratamiento contra *B. caballi*, pues detecta anticuerpos específicos durante un período más largo que la técnica cELISA (Schwint *et al.*, 2009).

El Servicio Diagnóstico Veterinario Nacional de Ames, en Iowa, ha ofrecido esta prueba por parte de sus laboratorios, para la detección de *B. caballi*, estudiando la validación de este test para el uso diagnóstico de forma rutinaria (Wise *et al.*, 2013).

#### **2.6.3.6.- Inmunocromatografía (ICT)**

Se basa en la migración de la muestra de suero a través de una membrana de nitrocelulosa, de manera que esta técnica inmunológica permite visualizar la reacción antígeno-anticuerpo por la acumulación del oro coloidal del conjugado en las zonas específicas de la membrana de nitrocelulosa donde se han fijado previamente antígenos recombinantes (Escalante *et al.*, 2001). La muestra de suero se debe añadir a la membrana de nitrocelulosa (que puede estar cortada en forma de tiras), de tal forma que migra por capilaridad hacia la zona donde se encuentran los antígenos recombinantes específicos del parásito o parásitos a detectar, conjugados con partículas de oro coloidal. Si la muestra contiene anticuerpos, éstos se unirán al conjugado formando un complejo antígeno-anticuerpo que seguirá migrando a través de la tira, hasta llegar a una zona donde hay antígenos recombinantes específicos sin conjugado, que se unirán a este

complejo (en el caso de que se haya formado), evidenciándose una línea que se ve a simple vista. Si la muestra problema es negativa, esta línea no aparecerá. Es una metodología rápida, ya que en unos pocos minutos se obtiene el resultado. No necesita un equipo especial para llevarse a cabo y puede emplearse fácilmente en campo (Huang *et al.*, 2006).

Esta prueba sería capaz de detectar inmunoglobulinas de diferentes tipos, como, por ejemplo, IgG, IgM o IgA a la vez y se puede desarrollar para la detección de un único hemoparásito, como sucede con *T. equi* empleando el antígeno *EMA-2* (Huang *et al.*, 2004) o se puede utilizar para el diagnóstico de ambos parásitos simultáneamente, usando los antígenos *EMA-2* y *BC48*, éste último para detectar *B. caballi* (Huang *et al.*, 2006). Muestra una alta sensibilidad y especificidad, detectando anticuerpos a los cuatro días postinfección (Huang *et al.*, 2004). La sensibilidad para detectar ambos parásitos sería similar a la de la prueba ELISA, y la especificidad para *T. equi* también sería similar a la de la ELISA, pero para *B. caballi* sería algo inferior, necesitándose una mejora en este sentido. Se ha observado también inespecificidad debida, quizás, a reacciones cruzadas (Huang *et al.*, 2006b).

Según Brüning (1996), la mejor prueba diagnóstica es aquella que tenga sensibilidad suficiente para una detección temprana de infecciones agudas y para la detección de animales crónicos. Tendría que ser muy específica para la diferenciación de ambos piroplásmidos y, además, económica en cuanto a tiempo de ejecución y dinero. Por tanto, aún no se ha llegado a diseñar esta prueba que denominan “gold”, por lo que hay autores que indican que la mejor forma de diagnosticar la PE, tanto para casos clínicos como para la realización de estudios epidemiológicos, es combinar métodos serológicos con los moleculares (Grause *et al.*, 2013).

#### **2.6.4.- Diagnóstico diferencial**

Existe un gran número de procesos infectocontagiosos que cursan con sintomatología muy similar a la de la piroplasmosis y con la que clínicamente podemos confundir, por ello, deberemos realizar un diagnóstico que nos permita diferenciar una babesiosis/theileriosis de enfermedades causadas por virus, bacterias y protozoos, entre las cuales se encuentran:

- Anemia Infecciosa Equina: proceso descrito por primera vez por Lignéé en 1843, en Francia. Es causado por un virus ARN de la familia Retroviridae. Es una enfermedad infecciosa, que afecta únicamente a miembros de la familia Equidae y que se desarrolla con un curso crónico. Su transmisión se realiza mediante mosquitos (*Anopheles*), tábanos, moscas de los establos (*Stomoxys*) u otros múscidos. La transmisión puede ser horizontal o vertical. Incluso a través de agujas contaminadas. Los síntomas desarrollados son fiebre intermitente, depresión, pérdida de peso, sudoración, poliuria, edemas e incluso diarreas y ataxia, desarrollando también anemia (Benavides y Rodríguez, 2009; González, 2011).
- Peste Equina: Enfermedad causada por un virus de la familia Reoviridae y transmitido principalmente por mosquitos del género *Culicoides*. Puede cursar de forma hiperaguda (hipertermia, taquipnea y disnea), de forma subaguda (hipertermia, inflamaciones edematosas en párpados, que se propagan desde la cabeza hacia el pecho, sobreviniendo la muerte por insuficiencia cardíaca) y de forma respiratoria aguda (apareciendo hipertermia, tos, disnea y/o edema pulmonar). Algunas veces aparecen formas mixtas y rara vez cursa en forma nerviosa (CFSPH, 2006).
- Anaplasmosis: Existen dos especies de rickettsias diferentes que causan la anaplasmosis equina: *Anaplasma phagocytophilum*, antes *Ehrlichia equi* (Stannard *et al.*, 1969) que provoca la antes denominada ehrlichiosis granulocítica equina y *Neorickettsia risticii*, antes *Ehrlichia risticii* (descubierta en 1979 en Maryland, EEUU e identificada como tal en 1984) que produce la ehrlichiosis monocítica equina.

La ehrlichiosis granulocítica equina cursa con síntomas tales como fiebre, anorexia, edemas, petequias ictericia o ataxia, junto con cambios hematológicos: anemia transitoria, leucopenia y trombocitopenia. La aparición de los casos se limita a los meses de otoño, invierno y primavera, y es vehiculada por garrapatas. Los vectores en EEUU son garrapatas del género *Ixodes*: *pacificus* y *scapularis*.

*Neorickettsia risticii* provoca una patología caracterizada por fiebre, anorexia, deshidratación, leucopenia, edemas, cólicos, diarrea acuosa y laminitis.

Además, presenta una marcada leucopenia, fundamentalmente una linfopenia. Es una enfermedad infecciosa transmitida por garrapatas que suelen aparecer entre los meses de junio y septiembre. *Neorickettsia ristici* puede transmitirse transplacentariamente al feto si las madres se infectan durante la gestación, citándose numerosos casos de abortos a término (Moreno, 2003; Benavides y Rodríguez, 2009).

- Leptospirosis: Esta enfermedad es producida por la bacteria *Leptospira interrogans*, siendo la serovariedad *L. bratislava* la más adaptada a los équidos. El curso de esta enfermedad puede ser agudo, subagudo o crónico. En los équidos aparece sintomatología caracterizada por un síndrome febril, septicemia, anorexia, ictericia, hematuria, abortos y uveítis periódica. Su transmisión se realiza mediante el contacto directo con la orina de animales infectados o por el contacto con material contaminado con dicha excreción (Blood *et al.*, 1982; Turk *et al.*, 2013).
  
- Tripanosomosis: *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma equiperdum* son dos de los protozoos flagelados responsables de la tripanosomosis equina. La transmisión de *Trypanosoma evansi* se atribuye a insectos hematófagos como los tábanos y otras moscas. Este proceso cursa con fiebre, anemia, caquexia, esplenomegalia, edemas, aumento de tamaño de los nódulos linfáticos y ocasionalmente, trastornos de locomoción. Esta enfermedad se caracteriza por su curso crónico, presenta una alta mortalidad y causa considerables pérdidas económicas en la industria ganadera de países tropicales y subtropicales (Monzón *et al.*, 1995; Benavides y Rodríguez, 2009).  
*Trypanosoma equiperdum* se transmite por el coito y no a través de vectores. Además, no se multiplica en la sangre sino en el sistema linfático. Cursa con fiebre leve, inflamación edematosa de los genitales externos, lesiones cutáneas y en las mucosas, así como parálisis (Benavides y Rodríguez, 2009).

## 2.7.- Vectores potenciales de Piroplasmosis Equina en España

Los Ixódidos (garrapatas duras) son los artrópodos vectores de la PE en nuestro país. Estos vectores pertenecen al orden Acari. Presentan un cuerpo recubierto de quitina, con un escudo dorsal completo en los machos, que sólo ocupa la región anterior del dorso en las hembras. Son varias las especies de Ixódidos o garrapatas duras los vectores potenciales de la babesiosis y theileriosis equinas, así, principalmente en nuestro país debemos tener en cuenta a: *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus bursa*, *Hyalomma marginatum marginatum* así, como a *Hyalomma lusitanicum*.

De entre todas las clasificaciones de ixodidos, la más aceptada es la descripción taxonómica propuesta por Hoogstraal y Aeschlimann (1982), que además es recogida por la FAO. A continuación, se muestra dicha clasificación para las especies más importantes identificadas en España (Habela *et al.*, 2005b, Montes *et al.*, 2007).

### Phylum Arthropoda (Siebold y Stanius, 1845)

#### Clase Arachnida (Lamarck, 1817)

#### Orden Acari (Nitzsh, 1818)

#### Suborden Metastigmata (Leach, 1815)

#### Superfamilia Ixodoidea (Banks, 1894)

#### Familia Ixodidae (Murray, 1877)

#### Subfamilia Hyalomminae (Hoogstraal, 1956)

#### Género *Hyalomma* (Koch, 1844)

Especie *H. marginatum marginatum* (Koch, 1844)

Especie *H. lusitanicum* (Koch, 1844)

#### Subfamilia Rhipicephalinae (Salmon y Stiles, 1901)

#### Género *Rhipicephalus* (Koch, 1844)

Especie *R. bursa* (Canestrini y Fanzago, 1877)

#### Género *Dermacentor* (Koch, 1844)

Especie *D. marginatus* (Sulzer, 1776)

Explicamos a continuación las características morfológicas más importantes de los géneros y especies de garrapatas de interés en nuestro país:

### 2.7.1.- Género *Dermacentor*

Podemos destacar de su morfología la presencia de un rostro corto con palpos mazudos y base del capítulo rectangular. Su escudo es bicolor sobre el que aparecen surcos marcados. Los machos no poseen placas ventrales (Gil *et al.*, 1979; Travassos, 1994; Habela *et al.*, 1998b).

#### *Dermacentor marginatus*

De las especies incluidas en este género, destacamos ésta debido a que es la que posee mayor difusión por todo el Sur de la Península. Es una garrapata que parasita una amplia gama de hospedadores, entre los que se incluye a los animales domésticos y gran parte de los silvestres (Rubel *et al.*, 2016).

Es una especie con ciclo trifásico y carácter ditrópico. Las formas inmaduras son endófilas puesto que parasitan a micromamíferos, y las formas adultas son exófilas, ya que están adaptadas a animales superiores. Los estadios inmaduros se alimentan principalmente en las regiones de la cara y la nuca de équidos y en las orejas de pequeños hospedadores silvestres (Moreno, 1995). Los adultos se fijan preferentemente en la zona de la frente, nuca, crinera y espalda (Kadulski, 1975).

La capacidad vectorial de esta especie está relacionada con la transmisión de *B. caballi* y *T. equi* a los équidos y con algunas *Rickettsias* (Habela *et al.*, 1998b).



**FIGURA 10:** Vista dorsal de una hembra de *D. marginatus*



**FIGURA 11:** Vista dorsal de un macho de *D. marginatus*

### 2.7.2.- Género *Hyalomma*

Morfológicamente, podemos describir este género como individuos de rostro largo y rectilíneo, con ojos salientes situados en una pequeña órbita o depresión del escudo. Sus patas no poseen una coloración uniforme. Los machos presentan placas anales, adanales y postanales en la cara ventral (Travassos, 1994; Gil *et al.*, 1979; Habela *et al.*, 1998b). Estas garrapatas son fundamentalmente desertícolas y se extienden por el Sur de la Península, estando activas durante la primavera y buena parte del verano (Estrada-Peña, 1994).

#### *Hyalomma marginatum marginatum*

Está presente prácticamente en toda España, salvando quizás, las regiones del norte (Habela *et al.*, 2005b). Es una garrapata que se comporta generalmente como difásica. Es endo/exofílica y mono/ditrópica. Los hospedadores principales son los micromamíferos, lepóridos, aves y reptiles fundamentalmente para las formas inmaduras, siendo los grandes mamíferos como es el caso de los équidos, los hospedadores de las formas adultas (Habela *et al.*, 1998b). Al ser una especie desertícola, los adultos aparecen principalmente durante la primavera y el verano (Caeiro, 1992; Estrada-Peña, 1994).

Los lugares de fijación varían, pero tienden a aparecer en la zona caudal y medial de las extremidades posteriores, por encima de los corvejones y en la zona inguinal y perineal (Ouhelli *et al.*, 1985; Yousfi-Monod y Aeschlimann, 1986).

Este ixódido está relacionada con la transmisión de *T. equi* y/o *B. caballi* (Habela *et al.*, 1998b).



FIGURA 12: Vista dorsal de una hembra de  
*H. m. marginatum*



FIGURA 13: Vista dorsal de un macho de  
*H. m. marginatum*

### ***Hyalomma lusitanicum***

Aparece por toda la Península Ibérica, pues posee un alto grado de adaptación al clima y la vegetación de tipo mediterráneo. Se trata de una especie trifásica, que puede ser endo o exofílica y ditrópica (Apanaskevich *et al.*, 2008). Las formas inmaduras tienen como hospedadores de elección a los lepóridos silvestres, mientras que las formas adultas muestran su preferencia por grandes mamíferos. Esta garrapata es muy prevalente en las zonas de dehesa arbolada (Habela *et al.*, 1998b). Y está activa durante la primavera, verano e inicios de otoño, entre mayo y noviembre (Encinas, 1986; Caeiro, 1992; Estrada-Peña, 1994).

Los lugares principales de fijación de los adultos son la región mamaria o escrotal, así como la zona pubiana y perineal, incluida la base de la cola (Ouhelli *et al.*, 1985; Encinas, 1986; Yousfi-Monod y Aeschlimann, 1986).

*H. lusitanicum* es un parásito habitual de los equinos, que pudiera transmitir *B. caballi* y/o *T. equi* a équidos (Habela *et al.*, 1998b; Apanaskevich *et al.*, 2008).



**FIGURA 14:** Vista dorsal de una hembra de *H. lusitanicum*



**FIGURA 15:** Vista dorsal de un macho de *H. lusitanicum*

### **2.7.3.- Género *Rhipicephalus***

*Rhipicephalus* es el género más frecuente y uno de los más conocidos en España. Esta garrapata muestra una amplia distribución por el país (Habela *et al.*, 2005b) y muestra una lista de hospedadores amplia, como pueden ser los animales domésticos, pequeños mamíferos, reptiles y aves (Nicholson *et al.*, 2018). Morfológicamente, se pueden describir como individuos de rostro corto, palpos triangulares y base del

capítulo hexagonal. Su escudo dorsal posee festones marginales. Los machos muestran placas anales grandes y con el borde redondeado. Las placas adanales están marcadas, con un surco anal bien definido (Gil, 1960; Travassos, 1994; Habela *et al.*, 1998b). Dentro de este género destacamos por su importancia en la transmisión de enfermedades y la frecuencia de presentación a la especie *Rhipicephalus bursa*.

### ***Rhipicephalus bursa***

Presenta una evolución difásica y un carácter monotrópico y exofílico en sus estadios evolutivos (Estrada-Peña, 1994).

Esta garrapata suele aparecer a lo largo de todo el año sobre alguno de sus hospedadores (Caeiro, 1992). La actividad de las formas adultas se extiende desde marzo a septiembre. Las larvas y ninfas predominan en otoño e invierno (Encinas, 1986; Habela *et al.*, 1998b; Estrada-Peña, 1994; Moreno, 1995). Está adaptada a hábitats de pocas precipitaciones, encontrándose fácilmente por toda la cuenca mediterránea (Yeruham *et al.*, 1989). Su distribución geográfica en España es muy amplia (Habela *et al.*, 2005b).

Respecto a los lugares de fijación, las formas inmaduras aparecen en la región cefálica, la zona facial, occipital y orejas. También en otras áreas como el cuello, espalda, dorso y flancos de los équidos. Los adultos se suelen fijar en la zona perineal, inguinal y extremidades (Encinas, 1986; Moreno, 1995; Yeruham *et al.*, 1989; Yousfi y Aeschlimann, 1986).

*R. bursa* posee gran capacidad vectorial de patógenos, pues parece que puede transmitir entre otros, a *T. equi* a los équidos, hecho comprobado experimentalmente en Extremadura (Olmeda *et al.*, 2004).



**FIGURA 16:** Vista dorsal de una hembra de *R. bursa*



**FIGURA 17:** Vista dorsal de un macho de *R. bursa*



### **3.- Estudios publicados**

---



### 3.1.- Estudio I

#### «Genetic variation of the $\beta$ -tubulin gene of *Babesia caballi* strains»

«Variación genética del gen de la  $\beta$ -tubulina de cepas de *Babesia caballi*»

**M<sup>a</sup> Guadalupe Montes Cortés<sup>1</sup>**, José Luis Fernández-García<sup>2</sup>, Miguel Ángel Habela Martínez-Estélez<sup>1</sup>

1.- Área de Parasitología. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria de Cáceres, España.

2.- Área de Producción Animal. Departamento de Producción Animal y Ciencia de los alimentos. Facultad de Veterinaria de Cáceres, España.

**Journal Arthropod-Borne Diseases, September 2017, 11(3): 334-353.**

**Factor de impacto JCR actual (2017/2018): 1,231**

**Artículo publicado en acceso abierto (open access).**

#### Abstract

**Background:** Equine piroplasmiasis is caused by two haemoprotozoan parasites: *Babesia caballi* and *Theileria equi*. Negative economic impact on international trade has been associated to endemic sites. This is the reason why carrier detection requires reliable diagnostic methods. Various diagnostic modalities can be used alone or in combination, including PCR. However, genetic variation of commonly used genes is still of debate. The aim of this research was to sequence the  $\beta$ -tubulin gene of a *B. caballi* strain from Spain and to compare it with known  $\beta$ -tubulin sequences.

**Methods:** DNA was isolated from a cryopreserved strain from Spain and acute and chronic carrier horses. Firstly, degenerated primer pairs were designed based on GenBank sequences of different *Babesia* and *Theileria* species for sequencing. The primers were redesigned to amplify both parasites, simultaneously. Finally, a species-specific primer pair for *B. caballi* was designed and a Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR (PCR-RFLP) assay performed to know the difference of known *B. caballi* strains.

**Results:** We provided new insights of the  $\beta$ -tubulin gene and a good molecular coverage of this gene, contributing with a number of useful primers to amplify *T. equi* and *B. caballi*. Moreover, PCR-RFLP assays based on the exon II of this gene confirmed the causative *B. caballi* strain in Spanish horses.

**Conclusion:** We reported useful primer pairs for diagnostic and a new sequence of the  $\beta$ -tubulin gene of *B. caballi*, which facilitate the development of future assays and the detection of infected horses, preventing thus the spread of this disease worldwide.

## Resumen

**Antecedentes:** La Piroplasmosis Equina está causada por dos hemoprotozoos: *Babesia caballi* y *Theileria equi*. Existe un gran impacto económico negativo asociado al comercio internacional de los équidos con zonas endémicas, esta es la razón por la cual la detección de los portadores crónicos requiere el uso de métodos fiables. Se pueden emplear diferentes técnicas de diagnóstico de forma individual o bien combinándolas, incluyendo la PCR. La variabilidad existente en los genes más usados en estas técnicas está aún en debate. El objetivo de este estudio fue secuenciar un fragmento del gen de la  $\beta$ -tubulina de una cepa de *B. caballi* procedente de España y compararlo con las secuencias del gen de la  $\beta$ -tubulina conocidas.

**Métodos:** Se aisló ADN de una cepa, previamente criopreservada, de procedencia española, así como de caballos que sufrían la enfermedad en una fase aguda y crónica. En primer lugar, se diseñaron una serie de cebadores basándose en secuencias de diferentes especies de *Babesia* y *Theileria* procedentes del GenBank. Estos cebadores fueron rediseñados para amplificar material genético de ambos parásitos (*B. caballi* y *T. equi*) de forma simultánea. Finalmente, se diseñó una pareja de cebadores especie-específicos para *B. caballi* y se desarrolló una PCR-RFLP para diferenciar entre las dos cepas conocidas de *B. caballi*.

**Resultados:** A través de este estudio proporcionamos nuevos conocimientos sobre el gen de la  $\beta$ -tubulina, contribuyendo, además, con una serie de cebadores útiles para amplificar ADN tanto de *B. caballi* como de *T. equi*. La PCR-RFLP basada en el exón II de este gen permitió confirmar cual era la cepa de *B. caballi* que afectaba a los caballos españoles.

**Conclusión:** Hemos diseñado una serie de cebadores útiles para el diagnóstico de los piroplásmidos equinos y también hemos aportado una nueva secuencia del gen de la  $\beta$ -tubulina de *B. caballi*. Todo ello podrá facilitar el desarrollo o mejora de otras técnicas y, por tanto, la detección de caballos infectados, previniendo de este modo, la propagación de esta enfermedad a nivel mundial.

**Original Article****Genetic Variation of the  $\beta$ -tubulin Gene of *Babesia caballi* Strains**

María Guadalupe Montes-Cortés <sup>1</sup>, \*José Luis Fernández-García <sup>2</sup>, Miguel Ángel Habela Martínez-Estélez <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Parasitology and Parasitological Diseases, Veterinary Faculty, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

<sup>2</sup>Genetics and Animal Breeding, Veterinary Faculty, Universidad de Extremadura, Cáceres, Spain

(Received 23 Mar 2015; accepted 10 Dec 2016)

**Abstract**

**Background:** Equine piroplasmiasis is caused by two haemoprotozoan parasites: *Babesia caballi* and *Theileria equi*. Negative economic impact on international trade has been associated to endemic sites. This is the reason why carrier detection requires reliable diagnostic methods. Various diagnostic modalities can be used alone or in combination including PCR. However, genetic variation of commonly used genes is still of debate. The aim of this research was to sequence the  $\beta$ -tubulin gene of a *B. caballi* strain from Spain and to compare it with known  $\beta$ -tubulin sequences.

**Methods:** DNA was isolated from a cryopreserved strain from Spain and acute and chronic carrier horses. Firstly, degenerated primer pairs were designed based on GenBank sequences of different *Babesia* and *Theileria* species for sequencing. The primers were redesigned to amplify both parasites, simultaneously. Finally, a species-specific primer pair for *B. caballi* was designed and a Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR (PCR-RFLP) assay performed to know the difference of known *B. caballi* strains.

**Results:** We provided new insights of the  $\beta$ -tubulin gene and a good molecular coverage of this gene, contributing with a number of useful primers to amplify *T. equi* and *B. caballi*. Moreover, PCR-RFLP assays based on the exon II of this gene confirmed the causative *B. caballi* strain in Spanish horses.

**Conclusion:** We reported useful primer pairs for diagnostic and a new sequence of the  $\beta$ -tubulin gene of *B. caballi*, which will facilitate the development of future assays and the detection of infected horses, preventing thus the spread of this disease worldwide.

**Keywords:** *Babesia caballi*,  $\beta$ -tubulin gene, Equine piroplasmiasis, PCR-RFLP marker

**Introduction**

Equine piroplasmiasis is caused by two different haemoprotozoan parasites: *Babesia caballi* (1) and *Theileria equi* (formerly *Babesia equi* Laveran 1901) (2). Both species are transmitted to horses by ticks found in tropical and subtropical regions (3). These parasites cause disease characterized by fever, anaemia, jaundice, weakness, loss of weight, blood urine, oedema, lymphadenopathy and hepatomegaly. Moreover, after infection, horses may remain life-long carriers when they are infected of *T. equi*, whereas horses may remain carriers of *B. caballi* from 1 to 4yr (4). In spite of this difference, both parasitaemia have a serious negative impact on

international trade (5), with southern Europe particularly affected as it is an endemic zone of this disease (5-6).

Detection of chronic carriers of Equine piroplasmiasis represents a problem for the equine industry, due to the limitations of the available diagnostic methods. Therefore, various diagnostic modalities can be used alone or in combination to diagnose infections (7). These methods are indirect methods such as ELISA and the indirect fluorescent antibody test (IFAT) or direct diagnosis such as microscopic examination of blood smears or PCR (8-7, 9).

344

\*Corresponding author: Dr JL Fernández-García,  
E-mail: mahabela@unex.es

<http://jad.tums.ac.ir>

Published Online: September 08, 2017

Classical single PCR (6), multiplex PCR (10-11), nested PCR (12, 13-14) or real-time PCR (15) are used to diagnose Equine piroplasmiasis. Oligonucleotides used in PCR were designed based on genes such as 18S rRNA (6-13-10- 15) or equi merozoite antigen gene *-ema1-* (12-16) to amplify *T. equi* genes. On the other hand, to diagnose *B. caballi*, genes such as 18S rRNA (6-10) or the rhoptry-associated protein gene *-rap1-* (17) are commonly used.

The  $\beta$ -tubulin gene is one of the genes used to diagnose Piroplasmids (18), although its use is not widespread in the detection of *B. caballi* because little is yet known about the genetic variability of this gene in this species, the proof of this is that there is only genetic information from one sequence in data bases (Acc. N°: AJ289246)

The prevalence of *B. caballi* in horses in our country ranges from 7.9% (García-Bo-canegra et al. 2013) to 21.3% (20). Whereby, the detection of chronic carriers is a prime goal to prevent the spread of this disease, which can be achieved by increasing the knowledge about genetic variation of the  $\beta$ -tubulin gene with differential diagnostic purposes.

The aim of this research was to sequence the  $\beta$ -tubulin gene from one isolate of *B. caballi* from Spain by developing primers using  $\beta$ -tubulin genes deposited in Gene Bank from different haemoprotozoan species, to compare it with one known sequence of this gene from *B. caballi* and to provide markers suitable for diagnosis and molecular epidemiology.

## Materials and Methods

### Blood samples

All the blood samples used in this research were collected from the jugular vein into sterile vacuum tubes (vacutainer®) with and without anticoagulant (EDTA) and routinely thin blood smears were stained and were examined under a microscope at 1500x magnification. *Babesia caballi* was detected

in the blood sample from Málaga (Andalusia, Spain) which was sent to our laboratories in Cáceres in 2006. This parasite was cultured in equine erythrocytes (21) and cryopreserved in liquid nitrogen, which still belongs to our sample bank (named GM Malaga strain). This isolated was used to obtain template DNA for sequencing the  $\beta$ -tubulin gene. Moreover, blood samples of acute infected and chronic carrier horses were collected from different regions of centre and southwest Spain in 2011 as follows: five samples from acute infected horses (Cáceres province) and samples from chronic carriers from Segovia (n=5), Cádiz (n=7), Badajoz (n=6) and Cáceres (n=2) (Fig. 1). All the acute cases were positive by microscopic examination but chronic carriers were negative to this procedure. These last blood samples were checked by IFAT (22) and by commercial cELISA test (kits from VMRD Inc. Pullman, WA, USA), being all of them *B. caballi* positive to both techniques (Fig. 1).

### DNA extraction

Whole genomic DNA was obtained from the cryopreserved strain, five samples from acute infected horses and 20 blood samples collected from chronic carriers, tested by cELISA to assess them as carriers of *B. caballi* parasite. Forty  $\mu$ L or 250 $\mu$ L of culture fluid or red cell, respectively, were processed by a proteinase K/salting out procedure (23-24) modified using Zymo-Spin IIC columns (Zymo Research Corporation, Irvine, CA 92614, USA) to purify nucleic acids. Genomic DNA was semi quantitatively analysed using Lambda DNA Marker ( $\lambda$  DNA-HindIII Digest, New England Biolabs®inc.) by visualization in 0.8% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide following manufacturer recommendations.

### Primer design and PCR amplification

Several available complete or partial sequences of the  $\beta$ -tubulin gene were down-

loaded from the Gene Bank (Table 1). These sequences, aligned using MEGA4 software (25), aimed at finding a conserved segment where universal PCR primers could be designed to amplify the longest fragment of this gene by conventional PCR.

All aligned stretches which expanded from nucleotide 845478 (ie, -2 nucleotide from start codon) to nucleotide 846287 regarding sequence CP001669 were selected for primers design. Because completely conserved segments were not found at both endpoints, useful primers, which included degenerate nucleotides, were obtained from this alignment as follows: B-Tub F and reverse B-Tub R (Table 2).

The fragment of  $\beta$ -tubulin gene of *B. caballi* was obtained by PCR based on these degenerate primers (which included nucleotides ambiguities, Table 2). In the first step, DNA from *in vitro* cultured *B. caballi* strain was used. Duplicated PCR were carried out in 50 $\mu$ L reaction volumes with 5 $\mu$ L of DNA template and 45 $\mu$ L mixture containing final concentration of 1X PCR buffer, 0.2mM dNTPs, 1pmol each primer (B-Tub R and F or B-Tub R2 and F2 depending on the desired reaction), 1.5MgCl<sub>2</sub> and 1 unit of Taq DNA polymerase (Ecogen®) on a thermal cycler 2720 (Life Technologies®). To maximize amplification success with these degenerate primers a modified-touchdown program was used as follows: (1) each of the first four cycles were run at different annealing temperatures ranging from 55 °C to 51 °C and (2) the remaining 37 cycles at 52 °C. The general amplification conditions were: 96 °C for 5min, then each cycle at 96° for 30s, primer annealing (see (1) above) for 30s and 72 °C for 1min. extension, finally 72 °C for 7min. Five  $\mu$ L of products for both PCR and, later, PCR-RFLP were always run in 1.5% LM agarose gels (Low Melting agarose) buffered on 0.5% TBE with power supply limited to 120v for 35–45min according the expected

fragment size and stained with ethidium bromide for checking. PCR products obtained from the Málaga isolated were further used for sequencing.

After sequencing the PCR product and realigning it to those in Table 2, a less degenerated primer pair was designed but in such way that it was able to amplify both the DNA template from *B. caballi* and *T. equi* simultaneously, since both species can be found in infected horses. The new designed primers were as follows: B-Tub F2 and B-Tub R2 (Table 2). The PCR conditions for this assay were: 94 °C for 5min, 94 °C 45s, primer annealing for 52 °C for 1min and 72 °C for 1min extension with 37 cycles, finally extension 72 °C for 7min. Reaction volumes consisted of 1 $\mu$ L of template and 19 $\mu$ L mixture containing final concentration of 1X PCR buffer, 0.2mM dNTPs, 1pmol each primer, 1.5MgCl<sub>2</sub> and 1 unit of Taq DNA polymerase (Ecogen®) on a thermal cycler 2720 (Life Technologies®).

#### DNA sequencing and resequencing

PCR product from the cultured isolate from Málaga was purified with ExoSAP-IT (GE Healthcare®). Sequencing and resequencing was performed to determine the genomic variations by the BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit in both directions using B-Tub F2 and B-Tub R2, respectively (26).

#### Species-specific primers for *Babesia caballi*

Three primer pairs were designed to amplify the  $\beta$ -tubulin gene of *B. caballi* from genomic DNA of cryopreserved strain. But the primer pair GM B-Tub F and GM B-Tub R (Table 2), which expanded from the start of the first intron to partially the second exon, was designed based on both sequences (this research and Acc. N. AJ289246) to specifically amplify *B. caballi*. Its specificity was studied using template DNA from *T. equi*, which showed no amplification (data not showed).

### Restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP)

To test the *B. caballi* strain described here a PCR-RFLP analysis was used. The PCR-RFLP assays were designed to discriminate both known sequences using software simulation. Using PROPHET 5.0 software (BBN Systems and technologies) a restriction mapping analysis was performed to predict restriction enzymes useful to discriminate between both known strains of *B. caballi* (the Spanish isolated Acc. N. KX358867 and the French one with Acc. N. AJ289246). Based on simulation of cleavage sites, two restriction enzymes, HaeIII and HinfI, were selected. The cutting prediction for each strain can be seen in Table 3.

### Results

This research provided a new sequence of the  $\beta$ -tubulin gene of *B. caballi* (GM Málaga strain). This DNA stretch was sufficiently long for a successful primer pairs design. As a result of comparing the  $\beta$ -tubulin gene of the two most important piroplasms species that impair horses, *T. equi* and *B. caballi*, a first primer pair (B-TubF and B-TubR, Table 2) was designed in order to amplify that gene from a DNA template of both parasites. Moreover, new and less degenerated primers pair could be designed (B-TubF2 and B-TubR2, Table 2) used for conventional PCR applications. The resulted amplicons had a size of 718bp and 826bp for *T. equi* and *B. caballi*, respectively (Fig. 2).

According to (27), the  $\beta$ -tubulin gene sequences from each of the two species differed in length (100bp approx.). The sequence of the  $\beta$ -tubulin gene of *B. caballi* obtained with these primers provided more

molecular information about the genetic variations of this conserved gene.

Both sequences (AJ289246 and KX358867) were truncated to accommodate to the shortest molecule, i.e., 460bp. Thus, this fragment of the  $\beta$ -tubulin gene of *B. caballi* partly covered exon I (nucleotide 1 to 63), but completely covered intron I (nucleotide 64 to 233) and exon II (nucleotide 234 to 460). Sixty-eight polymorphic sites were found between both sequences. The comparison of both sequences using BLASTN 2.2.20 (28) yielded 81% nucleotides identities and 3% open gaps. Focusing on exon II, they shared 92% identities with 19 (19 of 76 triples) silent mutations (synonymous substitutions), as estimated using the DnaSP software version 4.0. This analysis reported an unexpected number of polymorphisms between both strains at the coding region but without changing the primary structure of the protein, as should be in the case of strongly conserved genes such as the  $\beta$ -tubulin gene (27). Moreover, the first intron showed a minor size variation due to a 2bp deletion in the Spanish sequence. All these facts suggest the sequence of  $\beta$ -tubulin gene could be variable among and within species of *Babesia* parasites. Twenty DNA samples from chronic carriers and 5 samples from acute infected horses were amplified using our species-specific primers for *B. caballi*. All samples were positive. These PCR were digested with both restriction enzymes (HaeIII and Hinf I) to determine the strain causing the infection. HinfI cut the PCR amplicons but HaeIII does not cut them as was predicted. As a result, this assay was able to confirm that the infecting strain of these horses would be the Spanish strain (Fig. 3).

**Table 1. Sequences used to design primers**

Accession number	Species	Gene	Chromosome	Nucleotide positions or size	Author
CP001669	<i>Babesia equi</i>	Complete genome	1	845478...846856	Kappmeyer et al. 2012
AAGK01000002	<i>Theileria parva</i>	Complete genome	2	923513...925358	Gardner et al. 2005.
AJ289249	<i>Babesia equi</i>	Partial	--	349bp	Cacciò et al. 2000
XM-001611566	<i>Babesia bovis</i>	Complete cds	--	1343bp	Brayton et al. 2007
KC465972	<i>Babesia odoicoilei</i>	Partial cds	--	1275bp	Zamoto-Niikura et al. 2014
AB083377	<i>Babesia microti</i>	Complete cds	--	1651bp	Zamoto et al. 2004
AB860327	<i>Babesia ovata</i>	Partial cds	--	457bp	Damdinjav et al. unpublished
AP011947	<i>Theileria orientalis</i>	Complete genome	2	933579...934685	Hayashida et al. 2012
AJ289246	<i>Babesia caballi</i>	partial	--	460bp	Cacciò et al. 2000

**Table 2. Oligonucleotide primers used to amplify and sequence parasite  $\beta$ -tubulin gene.**

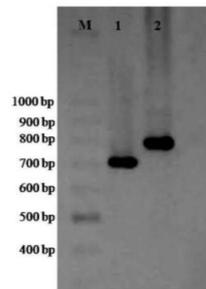
Primer Pair	Forward Sequence 5'-3' (F)	Reverse Sequence 5'-3' (R)	<i>B. caballi</i> Amplicon size	<i>T. equi</i> Amplicon size
<b>B-Tub</b>	GAATGAGRGARATCGTWCACA	CARCTTYAGNGTNCKRAAGCARA	826bp	Not done
<b>B-Tub 2</b>	GAATGAGGGARATCGTWCACA	CAGCTTAGRGTTCCKGAA-GCARAT	826bp	718
<b>GM B-Tub</b>	ACCCGG-TAAGTCGTAAACC	AGTTGTCRGGYCTGAA-GAGT	345bp	No amplification

**Table 3. Restriction mapping analysis for predicting restriction enzymes. (\*excluding cuts within primers)**

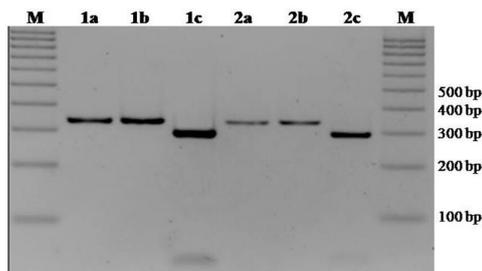
<i>B. caballi</i> strain	Size of PCR product	Predicted fragment sizes	
		<i>HaeIII</i> (GG↓CC)	<i>HinfI</i> (G↓ANTC)
Cacciò et al. (2000)	347	249,88 *	299,48
This research	345	Uncut *	297,48



**Fig. 1.** Geographical distribution of collected samples



**Fig. 2.** Amplicons of *Theileria equi* and *Babesia caballi* using primers pairs B-Tub 2. Lane M, 100bp size marker. Lane 1: Amplicon of *T. equi* (718bp) Lane 2: Amplicon of *B. caballi* (826bp)



**Fig. 3.** Restriction enzymes assays. Lane M, 100bp size marker. Lane 1a: PCR product of DNA from cultivated isolate amplified with primers pairs GM B-Tub. Lane 1b: PCR product digested with HaeIII (uncut). Lane 1c: PCR product digested with HinfI. Lane 2a: PCR product of DNA from an acute infected horse with primers pairs GM B-Tub. Lane 2b: PCR product digested with HaeIII (uncut). Lane 2c: PCR product digested with HinfI

## Discussion

This research has provided new insights into the  $\beta$ -tubulin gene of *B. caballi*, the key factor being that there was a unique and partial sequence available in the Gene Bank for this piroplasm. This sequence belonged to a different *B. caballi* strain after comparison with the sequence from (27). Moreover, it can be suggested that genetic variation should be expected among *B. caballi* strains even for conserved genes. The occurrence of genetic variations in certain conserved genes like the  $\beta$ -tubulin gene (described in this research), could indicate not only the existence of different strains of *B. caballi*, but also suggests the study of possible higher taxonomic levels because in our study the shared identity was within the 92% for coding segments. Similar results were recently reported for the  $\beta$ -tubulin gene sequence of *B. ovata*. This *Babesia* shared 94.8–100% identity within species but the shared sequence identity of *B. ovata* with other species was 87.0–90.6%, 83.7–86.3%, and 82.7–85.4% to *B. bigemina*, *B. odocoilei* and *B. divergens*, respectively (29).

Based on genetic knowledge of 18S rRNA gene both for *B. caballi* and *T. equi* (30–31) there were different genotypes in Spain for both species. On the one hand, (32) conducted phylogenetic analysis based on the same gene to report that there were two *B. caballi* clades. However, (33) established four *B. caballi* clades using the BC48 gene. On the other hand, (32) found three *T. equi* clades. However, (34) announced that there were not three, but four *T. equi* clades. Phylogenetic analysis by (33) using the ema-1 gene divided the sequences into four *T. equi* clades. (35) using a phylogenetic study based on both the 18S rRNA gene and the  $\beta$ -tubulin gene have shown *T. annae* and its synonyms are not *Theileria* parasites instead they are

*Babesia* species, being the  $\beta$ -tubulin decisive to determine that reclassification.

This information suggests that taxonomic classification of equine piroplasms is not yet defined completely as reported (3). According to (36) and (37), a new diagnostic test on additional or new antigens is needed because nowadays there is not a gold standard test for detecting Equine piroplasmosis. Specifically, (37) showed there was lack of concordance between the *B. caballi* cELISA, IFAT, and nPCR. Hence, the importance of this study that contributes to the enrichment of current genetic information of an unknown  $\beta$ -tubulin gene of *B. caballi*.

Based on the PCR-RFLP analysis, it was possible to discriminate different piroplasms species as shown by (27) where cattle piroplasms such as *Theileria sergenti*, *T. annulata*, *B. bigemina*, *B. bovis* and *B. a major* were efficiently discriminated using *RsaI* restriction enzyme. Another study also valued PCR-RFLP as a specific analysis to confirm species diagnosis as has been shown for *B. bigemina* with *VspI* digestion of the small subunit rRNA. Using *BsII* and *HinI* with PCR amplicons from the 18S ribosomal RNA gene, discriminated subspecies of canine piroplasms from other species such as *T. equi*, *T. annae* and *B. conradae*.

PCR-RFLP assays may not be necessary to discriminate between *B. caballi* and *T. equi* species due to the different sizes of their intron I (27 and this study). However, this difference in size was as short as 2bp between both *B. caballi* strains, which cannot be seen with agarose gels. This is the reason why PCR-RFLP assays were selected to discriminate the GM Málaga strain from the strain described by (27), so this study shows for the first time that PCR-RFLP assays were used in order to discriminate among different strains of *B. caballi* species assuming predictions based on the sequence deposited in the Gene Bank. Moreover, although PCR-

RFLP compares a limited number of nucleotides, restriction enzyme digestion was in full accordance with the predicted target based on the sequence of the GM Málaga strain even when using DNA from naturally infected horses.

Finally, this study has provided several new and useful primer pairs although they should be more deeply assessed for diagnostic purposes (acute infected horses and chronic *B. caballi* carriers) in future assays.

## Conclusion

We reported here that the  $\beta$ -tubulin gene of *B. caballi* shows high genetic variation, which will be useful to facilitate the development of more precise molecular assays for the detection of infected horses. This is equally relevant at local and international levels, helping to prevent the spread of this disease worldwide in the future.

## Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the collaboration of the veterinarians and owners of the horse farms where the samples were collected. The authors declare that there is no conflict of interest.

## References

1. Rodríguez Bautista JL, Ikadai H, You M, Battsetseg B, Igarashi I, Nagasawa H, Fujisaki K (2001) Molecular evidence of *Babesia caballi* (Nuttall and Strickland, 1910) parasite transmission from experimentally-infected SCID mice to the ixodid tick, *Haemaphysalis longicornis* (Neuman, 1901). *Vet Parasitol.* 13: 185–191.
2. Mehlhorn H, Schein E (1998) Description of *Babesia equi* (Laveran, 1901) as *Theil-*

- eria equi* (Mehlhorn, Schein 1998). Parasitol Res. 84: 467–475.
3. Uilenberg G (2006) Babesia: A historical overview. Vet Parasitol. 138: 3–10.
  4. De Waal DT, Van Heerden J (1994) Equine Piroplasmiasis. In: Coetzer JAW, Tustin RC (Eds) Infectious Diseases of Livestock. Oxford University Press, New York, pp. 295–304.
  5. Friedhoff KT, Tenter AM, Müller I (1990) Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 9: 1187–1194.
  6. Bashiruddin JB, Cammà C, Rebelo E (1999) Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. Vet Parasitol. 84: 75–83.
  7. Wise LN, Kappmeyer LS, Mealey RH, Knowles DP (2013) Review of equine piroplasmiasis. J Vet Intern Med. 27: 1334–1346.
  8. Böse R, Jorgesen WK, Dalglish RJ, Friedhoff KT, de Vos AJ (1995) Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. Vet Parasitol. 57: 61–74.
  9. Mans BJ, Pienaar R, Latif AA (2015) A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. Int J Parasitol Parasites Wildl. 4: 104–118.
  10. Alhassan A, Pumidonming W, Okamura M, Hirata H, Battsetseg B, Fujisaki K, Yokoyama N, Igarashi I (2005) Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. Vet Parasitol. 129: 43–49.
  11. Sumbria D, Singla LD, Sharma A (2016b) *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in equines in Punjab: A study on serological and molecular prevalence. Trop Anim Health Prod. 48: 45–52.
  12. Nicolaiewsky TB, Richter MF, Lunge VR, Cuhna CW, Delagostin O, Ikuta N, Fonseca AS, Silva SS, Ozaki LS (2001) Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. Vet Parasitol. 101: 9–21.
  13. Rampersad J, Cesar E, Campbell MD, Samlal M, Ammons D (2003) A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. Vet Parasitol. 114: 81–87.
  14. Sumbria D, Singla LD, Kumar S, Sharma A, Dahiya RK, Setia R (2016a) 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 Tropica. 155: 104–112.
  15. Kim C, Conza LB, 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.
  16. Ueti MW, Palmer GH, Kappmeyer LS, Scoles GA, Knowles DP (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.
  17. Bhoora R, Quan M, Zwegarth E, Guthrie AJ, Prinsloo SA, Collins NE (2010) 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.
  18. Zamoto A, Tsuji M, Wei Q, Cho SH, Shin EH, Kim TS, Leonova GN, Hagiwara K, Asakawa M, Kariwa H, Takashima I, Ishihara C (2004) Epizootiologic survey for *Babesia microti* among small wild mammals in North-eastern Eurasia and geographic diversity in the  $\beta$ -tubuline gene sequences. J Vet Med Sci. 66: 785–792.

19. García-Bocanegra I, Arenas-Montes A, Hernández E, Adaszek L, Carbonero A, Almería S, Jaén-Téllez JA, 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.
20. Habela MA, 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. *Revista Equinus* 11: 17–34.
21. Zweygarth E, Lopez-Rebollar LM, Norton J, Guthrie AJ (2002) Culture, isolation and propagation of *Babesia caballi* from naturally infected horses. *Parasitol Res.* 88: 460–462.
22. Camacho AT, Guitian FJ, Pallas E, Gestal JJ, Olmeda AS, Habela MA, Telford SR, Spielman A (2005) *Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* Infections in Horses in Galicia, Spain. *Trop Anim Health Prod.* 37: 293–302.
23. Millar SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215.
24. Fernández-García JL (2012) The endangered *Dama dama mesopotamica*: genetic variability, allelic loss and hybridization signals. *Contrib. Zool.* 81: 223–233.
25. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24: 1596–1599.
26. Barbosa AM, Fernández-García JL, Carranza J (2009) A new Marker for rapid sex identification of red deer (*Cervus elaphus*). *Hystrix It J Mamm.* 20: 169–172.
27. Cacciò S, Cammà 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.
28. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) BLASTN 2.2.20 (Ver. Feb-08-2009) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–3402.
29. Sivakumar T, Tattiyapong M, Okubo K, Suganuma K, Hayashida K, Igarashi I, Zakimi S, Matsumoto K, Inokuma H, Yokoyama N (2014) PCR detection of *Babesia ovata* from questing ticks in Japan. *Ticks Tick Borne Dis.* 5: 305–310.
30. Criado-Fornelio A, González-del-Río MA, Buling-Saraña A, Barba-Carretero JC (2004) The “expanding universe” of piroplasms. *Vet Parasitol.* 119: 337–345.
31. Nagore D, García-Sanmartín J, García-Pérez AL, Juste RA, 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.
32. Bhoora R, Franssen L, Oosthuizen MC, Guthrie AJ, Zweygarth E, Penzhorn BL, Jongejan F, Collins NE (2009) Sequence Heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. *Vet Parasitol.* 159: 112–120.
33. Munkhjargal T, Sivakumar T, Battsetseg B, Nyamjargal T, Aboulaila M, Purevtseren B, Bayarsaikhan D, Byambaa B, Terkawi MA, Yokoyama N, Igarashi I (2013) Prevalence and genetic diversity of equine piroplasmosis in Tov province, Mongolia. *Infect Genet Evol.* 16: 178–185.
34. Alanazi AD, Said AE, Morin-Adeline V, Alyousif MS, Slapeta J (2014) Quantitative PCR detection of *Theileria equi*

- using laboratory workflows to detect asymptomatic persistently infected horses. *Vet Parasitol.* 206: 138–145.
35. Baneth G, Florin-Christensen M, Cardoso L, Schnittger L (2015) Reclassification of *Theileria annae* as *Babesia vulpes* sp. nov. *Parasit Vectors.* 8: 207.
36. El-Sayed SAES, Rizk MA, Terkawi MA, Mousa A, El Said ESES, Elsayed G, Fouda M, Yokoyama N, Igarashi I (2015) Cocktail of *Theileria equi* anti-gens for detecting infection in equines. *Asian Pac J Trop Biomed.* 5: 977–981.
37. Mahmoud MS, El-Ezz NT, Abdel-Shafy S, Nassar SA, El Namaky AH, Khalil WK, Knowles D, Kappmeyer L, Silva MG, Suarez CE (2016) Assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in equine populations in Egypt by molecular, serological and haematological approaches. *Parasit Vectors.* 9: 260.

### 3.2.- Estudio II

#### «Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Spain»

«Seroprevalencia de *Theileria equi* y *Babesia caballi* en caballos de España»

**M<sup>a</sup> Guadalupe Montes Cortés<sup>1</sup>**, José Luis Fernández-García<sup>2</sup>, Miguel Ángel Habela Martínez-Estélez<sup>1</sup>

1.- Área de Parasitología. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria de Cáceres, España.

2.- Área de Producción Animal. Departamento de Producción Animal y Ciencia de los alimentos. Facultad de Veterinaria de Cáceres, España.

**Parasite 2017; 24:14. DOI: <https://doi.org/10.1051/parasite/2017015>**

**Factor de impacto JCR actual (2017): 2,069**

**Artículo publicado en acceso abierto (open access)**

#### Abstract

Equine piroplasmoses are enzootic parasitic diseases distributed worldwide with high incidence in tropical and subtropical regions. In Spain, there is insufficient epidemiological data about equine piroplasmoses. The main aim of the present study was therefore to estimate the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in five regions and obtain information about the risk factors. This study was conducted in the central and south-western regions of Spain, using indirect fluorescence antibody testing (IFAT) in 3,100 sera samples from apparently healthy horses of different ages, breeds, coat colours, genders and geographical locations. The overall seroprevalence was 52%, consisting of 44% seropositive for *T. equi* and 21% for *B. caballi*. There was a significant association between age ( $p<0.0001$ ), breed ( $p<0.004$ ), geographical location ( $p<0.0001$ ) and the seroprevalence, but neither the coat colour nor the gender was significantly associated with prevalence. In addition, it was proved that most of the geographic areas showed a moderate to high prevalence. The statistical  $\kappa$  value was used to compare the results obtained by IFAT and by competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA) utilised to test some samples ( $n=108$ ) and showed a higher concordance for *T. equi* ( $\kappa=0.68$ ) than for *B. caballi* ( $\kappa=0.22$ ). Consequently, this revealed the importance of developing an appropriate technique to detect each haemoparasite.

### Resumen

Las Piroplasmosis Equinas (PE) son enfermedades enzoóticas parasitarias que se distribuyen a nivel mundial y muestran una alta incidencia en regiones tropicales y subtropicales. En España existen pocos datos epidemiológicos sobre esta enfermedad. El objetivo principal de este estudio fue, por un lado, estimar la prevalencia de *Babesia caballi* y *Theileria equi* en cinco regiones españolas y, por otro lado, obtener información sobre los factores de riesgo asociados a esta hemoparasitosis.

Este estudio se llevó a cabo en diferentes regiones del centro y suroeste de España, empleando la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para detectar la presencia de anticuerpos en 3100 muestras de sueros de caballos aparentemente sanos, de diferentes edades, razas, colores de la capa, sexos y localizaciones geográficas. La seroprevalencia total obtenida fue del 52%, siendo un 44% de los animales seropositivos a *T. equi*, un 21% a *B. caballi* y un 13% seropositivos a ambos parásitos. Se halló una asociación significativa entre la edad ( $p<0,0001$ ), la raza ( $p<0,004$ ), la localización geográfica ( $p<0,0001$ ) y la seropositividad. Sin embargo, ni el color de la capa ni el sexo se asociaron significativamente con la seroprevalencia. Además, se constató que la mayoría de las áreas geográficas analizadas mostraban una seroprevalencia de moderada a alta. También se calculó el índice  $\kappa$  de Cohen para determinar el grado de acuerdo entre la técnica IFI y la cELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas). Se eligieron al azar 108 sueros ( $n=108$ ) para realizar la comparación entre ambas técnicas. Los resultados del índice  $\kappa$  mostraron que las dos técnicas poseían una mayor concordancia para *T. equi* ( $\kappa=0,68$ ) que para *B. caballi* ( $\kappa=0,22$ ).

Estos resultados nos llevaron a concluir que existe una gran necesidad de desarrollar una técnica apropiada para detectar cada hemoparásito.

## Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Spain

Maria Guadalupe Montes Cortés<sup>1</sup>, José Luis Fernández-García<sup>2,\*</sup>,  
 and Miguel Ángel Habela Martínez-Estélez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Parasitology and Parasitic Diseases, Animal Health Department, Veterinary Faculty, University of Extremadura, 10071 Cáceres, Spain

<sup>2</sup> Genetics and Animal Breeding, Veterinary Faculty, University of Extremadura, 10071 Cáceres, Spain

Received 17 January 2017, Accepted 17 April 2017, Published online 12 May 2017

**Abstract** – Equine piroplasmoses are enzootic parasitic diseases distributed worldwide with high incidence in tropical and subtropical regions. In Spain, there is insufficient epidemiological data about equine piroplasmoses. The main aim of the present study was therefore to estimate the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in five regions and obtain information about the risk factors. This study was conducted in the central and south-western regions of Spain, using indirect fluorescence antibody testing (IFAT) in 3,100 sera samples from apparently healthy horses of different ages, breeds, coat colours, genders and geographical locations. The overall seroprevalence was 52%, consisting of 44% seropositive for *T. equi* and 21% for *B. caballi*. There was a significant association between age ( $p < 0.0001$ ), breed ( $p < 0.004$ ), geographical location ( $p < 0.0001$ ) and the seroprevalence, but neither the coat colour nor the gender was significantly associated with prevalence. In addition, it was proved that most of the geographic areas showed a moderate to high prevalence. The statistical  $\kappa$  value was used to compare the results obtained by the IFAT and the competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA) utilised to test some samples ( $n = 108$ ) and showed a higher concordance for *T. equi* ( $\kappa = 0.68$ ) than for *B. caballi* ( $\kappa = 0.22$ ). Consequently, this revealed the importance of developing an appropriate technique to detect each haemoparasite.

**Key words:** Equine piroplasmoses, Spain, Seroprevalence, IFAT, cELISA.

**Résumé** – Séroprévalence de *Theileria equi* et *Babesia caballi* chez les chevaux en Espagne. Les piroplasmoses équine sont des parasitoses enzootiques cosmopolites qui existent surtout dans les régions tropicales et subtropicales. En Espagne, peu de données épidémiologiques sont disponibles sur les piroplasmoses équine. Ainsi, le principal objectif de la présente étude a été d'estimer la séroprévalence de l'infection par *Theileria equi* et *Babesia caballi* dans cinq régions et obtenir des informations sur les facteurs de risque. Cette étude a été menée dans les régions du centre et du sud-ouest de l'Espagne en utilisant le test d'immunofluorescence indirecte (IFI) sur un échantillon de 3100 sérums de chevaux apparemment sains de différents âges, races, robes, sexe et origines géographiques. La séroprévalence globale était de 52 %, y compris 44 % séropositifs pour *T. equi* et 21 % pour *B. caballi*. Il y avait une association significative entre l'âge ( $p < 0.0001$ ), la race ( $p < 0.004$ ), la localisation géographique ( $p < 0.0001$ ) et la séroprévalence. Cependant, ni la couleur du pelage ni le sexe n'avaient de corrélation significative avec la séroprévalence. En outre, la plupart des régions étaient dans un état de prévalence modérée à élevée. Le coefficient de concordance  $\kappa$  a été utilisé pour comparer les résultats obtenus par IFI et cELISA pour tester 108 échantillons, et a montré une concordance plus élevée pour *T. equi* ( $\kappa = 0.68$ ) que pour *B. caballi* ( $\kappa = 0.22$ ). Cela démontre l'importance de développer une technique appropriée pour détecter chaque hémoparasite.

### Introduction

Equine piroplasmoses (EPs) are important and widespread tick-borne diseases in horses. This parasitic disease affects all equid species including horses, donkeys, mules and zebras. Two species of parasites, *Babesia caballi* (Nuttall and

Strickland 1910) and *Theileria equi* (formerly *Babesia equi*, Laveran 1901), cause this infection. These protozoa parasitise erythrocytes and they can co-infect animals [18, 65, 83]. The disease is characterised by a variety of symptoms such as fever, anaemia, jaundice, haematuria and lymphadenopathy [32]. The initial acute phase can cause death, but the survivor animals become carriers and reservoirs of infection for vector ticks [28]. Therefore, large economic losses are generated due

\*Corresponding author: pepelufe@unex.es

to the treatments, the decrease in performance of the animals or the negative impact on international trade [31, 56].

In Spain, EPs are enzootic diseases [13, 31] as they have been diagnosed in autochthonous horses for decades [21, 22, 41–43] but there is insufficient epidemiological information about this disease and its vectors in Spain.

Several diagnostic methods are used to detect the infection, such as microscopic examination of stained blood smears, which is useful in the acute phase of infection onset, though serological techniques are better in order to identify chronic carriers. These techniques include the complement fixation test (CFT), the indirect fluorescent antibody test (IFAT), and the competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA), which utilises the *EMA-1* protein and a specific monoclonal antibody (MAb) to detect *T. equi*, and the recombinant *RAP-1* protein and an MAb reactive with a peptide epitope of a 60 kDa *B. caballi* antigen to diagnose the other parasite. The last two tests are recommended by the World Organisation for Animal Health (OIE) for the serodiagnosis of EP [73]. The diagnosis of these haemoprotozoan infections can be carried out using molecular assays such as conventional single PCR [13], multiplex PCR [7, 96], nested PCR [72, 78, 95] or real-time PCR [54]. Thus, the combination of two or more of these methods is currently recommended to diagnose the EP [102].

The main goal of this survey was to estimate the seroprevalence and geographic distribution of EP in central and southwest Spain. In fact, it is the largest study that has been conducted in Spain. It is intended to identify areas in which to implement more effective control measures against both the pathogens and their vectors. In addition, we analysed 108 randomly selected sera samples to compare concordance of the two serological methods most often used in the diagnosis of this parasitic infection that affects equids in Spain: the indirect fluorescence antibody test (IFAT) vs. an immunoenzymatic assay (cELISA). This study helped to further understand the situation of the Purebred Spanish Horse with regard to these infections in this emblematic and autochthonous breed.

## Materials and methods

### Sampled animals and area of study

This study was carried out between February and September 2014 in various regions of Spain: Andalusia, Castilla-La Mancha, Castilla-León, Extremadura and Madrid (Fig. 1). Blood samples were collected from horses' jugular veins into sterile vacuum tubes with and without anticoagulant. Plasma and serum samples were obtained by centrifugation at 4° C at 2500 rpm for 10 min and were stored at –20° C until testing. The plasma and sera were used for the IFAT and the cELISA, respectively.

This study included 3100 animals (1309 females and 1791 males) with no clinical signs of piroplasmoses between 9 months and 30 years of age (mean age: 7.5 years). Different breeds were tested including the Spanish Pure Breed horse, Anglo-Arabian, Arabian horse, Balearic horse, Hanoverian horse, Lusitano, Thoroughbred, Selle Français and crossbred horses. Information on aptitude was annotated; thus, most of

the animals were breeding horses though there were saddle horses (recreation or sports). Data were studied according to recorded information sent by owners and/or veterinarians: gender, breed, age, geographical origin and coat colour.

Win Episcope 2.0 was used [99] to estimate the minimal sample size needed to guarantee the validity of this study. According to the equine census data obtained in 2013 from MAGRAMA (“Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente”, Spain) [61] in each region studied (Table S1), at least 381 animals from each area were sufficient in order to detect a 50% prevalence of subclinical EP infection with a certainty of 95% [89]. However, in the region of Madrid, the sample size was smaller than necessary ( $n = 312$ ) (Fig. 1, Table S1).

### Indirect fluorescence antibody test (IFAT) and immunoenzymatic assay (cELISA)

The IFAT was used for the detection of antibodies against *T. equi* and *B. caballi*. The antigen was obtained from naturally infected horses with a parasitaemia higher than 3%. Both protocols to prepare the *T. equi* and the *B. caballi* antigen and the assay were conducted as described by Camacho et al. [21]. The slides were examined under the fluorescence microscope (Leica DMLS<sup>®</sup>) at a magnification of 400 (10 × 40). Positive and negative sera were included in each run as controls.

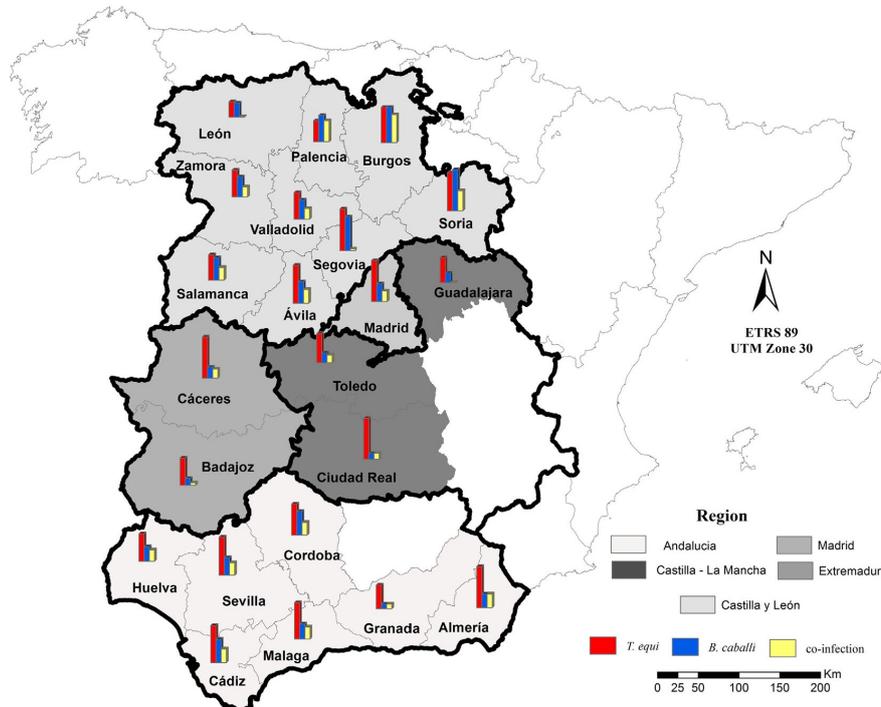
The cELISA test was carried out with commercially available test kits (VMRD, Inc. Pullman, WA, USA) to detect antibodies against *T. equi* and *B. caballi*. These tests were conducted following the manufacturer's instructions. The plates were read on a plate reader (Multiskan Ascent, Thermo Electron Corporation<sup>®</sup>) at an optical density of 620 nm. Samples associated with percent inhibition (PI) values <40% were considered negative, while if the PI value was ≥40%, sera were considered positive.

The IFAT and the cELISA techniques are the most useful methods to diagnose equine piroplasmoses. For this reason, a comparison between the techniques was needed since it had not been done previously in Spain. Thus, from the 3100 serum samples tested by IFAT, 108 samples were randomly selected and tested by cELISA.

### Statistical analysis

The seroprevalences of *T. equi*, *B. caballi* and co-infection relative to certain characteristics (age, breed, coat colour, gender and geographical location) were determined at the 95% confidence interval (CI). These epidemiological data were compared with the IFAT results using a logistic regression-binary (LR-binary). Animals were considered as units of analysis for determining the significance of association. Data analyses were performed using Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 11.0 software for Windows. The odds ratios were calculated at a 95% confidence interval (95% CI). Tests with a  $p$ -value ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Due to the semi-quantitative characteristic of age as a variable, it was evaluated by both (i) exploring the difference in means between categories in the IFAT variable, and (ii) using



**Figure 1.** Map of equine piroplasmosis prevalence by region in Spain. The histogram within each province represents the positive horses using percentages.

it as an ordinal variable, then using the OR calculated as the average value of each risk factor compared to the previous in descending order. The statistical significance of seroprevalence between pairs of regions (Castilla-La Mancha, Andalusia, Castilla-León, Extremadura and Madrid) was calculated using a non-parametric test with the Monte Carlo Method. In order to determine the concordance between the two serological techniques (the IFAT and the cELISA), Cohen's  $\kappa$  test was used [24]. The  $\kappa$  values  $< 0$  indicate no agreement and values between 0 and 0.20 indicate slight agreement, 0.21–0.4 fair agreement, 0.41–0.60 moderate, 0.61–0.80 substantial and 0.81–1 almost perfect agreement.

## Results

### Seroepidemiological study

The serological examination of 3100 horses by IFAT showed that the overall seroprevalence of the equine piroplasmoses in southwest Spain was 52.45% ( $SE = 0.009$ ). Of the 3100 tested samples, 1381 sera (44.55%;  $SE = 0.009$ ) were positive for *T. equi*, 643 samples (20.74%;  $SE = 0.007$ ) were positive for *B. caballi* and 398 horses (12.84%;  $SE = 0.006$ ) had antibodies against both parasites.

The seroprevalence in horses from Castilla-La Mancha was the highest (67.54%) (significance calculated by the Monte

Carlo method [95% CI];  $p < 0.001$ ). The prevalence results in horses from Andalusia, Castilla-León and Extremadura (50.94%; 53.62% and 51.5%, respectively) were not statistically significant (significance calculated by the Monte Carlo method [95% CI] *ns*). The lowest seroprevalence was observed in Madrid (38.14%) (significance calculated by the Monte Carlo method [CI 95%];  $p < 0.001$ ) (Table 1). The mean age by region was as follows: 6.24 ( $SE = 0.183$ ), 7.15 ( $SE = 0.250$ ), 10.25 ( $SE = 0.320$ ), 6.43 ( $SE = 0.161$ ) and 8.26 ( $SE = 0.384$ ) years for Andalusia, Castilla-La Mancha, Castilla-León, Extremadura and Madrid, respectively.

In this study, it has been shown that *T. equi*, *B. caballi* and mixed infection were detected across regions. Notably, the parasite detected most frequently was *T. equi*, ranging from 62.57 to 32.37% in Andalusia and Madrid, respectively (Table 1). However, *B. caballi* prevalence was half as high, ranging from 31.16 to 12.20% in Castilla-León and Extremadura, respectively (Table 1). The maximum of mixed infections was 16.38% in Castilla-León (Table 1). The regional seroprevalence for male and female horses is shown in Table 1 (see also Table S2 for province details).

Approximately half of the tested Spanish Pure Breed horses were seropositive (50.89%) consisting of 41.69% horses *T. equi* seropositive and 16.32% seropositive for *B. caballi*. Meanwhile, 9.90% of the tested horses were positive for both parasites.

**Table 1.** Prevalence of *T. equi* and *B. caballi* antibodies (by IFAT) in horses from different regions of Spain

Region	Seroprevalence	<i>T. equi</i> (% ± SE)	<i>B. caballi</i> (% ± SE)	Co-infection (% ± SE)	Total (% ± SE)
Andalusia	Males	241/560 (43.04 ± 0.021)	105/560 (18.75 ± 0.017)	77/560 (13.75 ± 0.014)	269 (48.04 ± 0.021)
	Females	175/394 (44.42 ± 0.025)	107/394 (27.16 ± 0.022)	65/394 (16.50 ± 0.019)	217 (55.07 ± 0.025)
	Overall	416 (43.61 ± 0.016)	212 (22.22 ± 0.013)	142 (14.88 ± 0.011)	486 (50.94 ± 0.016)
Castilla-La Mancha	Males	125/207 (60.39 ± 0.034)	42/207 (20.29 ± 0.028)	34/207 (16.43 ± 0.026)	133 (64.25 ± 0.033)
	Females	114/175 (65.14 ± 0.036)	37/175 (21.14 ± 0.031)	26/175 (14.86 ± 0.027)	125 (71.43 ± 0.034)
	Overall	239 (62.57 ± 0.025)	79 (20.68 ± 0.021)	60 (15.71 ± 0.019)	258 (67.54 ± 0.024)
Castilla-León	Males	165/424 (38.92 ± 0.024)	130/424 (30.66 ± 0.022)	62/424 (14.62 ± 0.017)	233 (54.95 ± 0.024)
	Females	103/266 (38.72 ± 0.030)	85/266 (31.95 ± 0.029)	51/266 (19.17 ± 0.024)	137 (51.50 ± 0.031)
	Overall	268 (38.84 ± 0.019)	215 (31.16 ± 0.018)	113 (16.38 ± 0.014)	370 (53.62 ± 0.019)
Extremadura	Males	167/391 (42.71 ± 0.025)	61/391 (15.60 ± 0.018)	34/391 (8.70 ± 0.014)	194 (49.61 ± 0.025)
	Females	190/371 (51.21 ± 0.026)	32/371 (8.63 ± 0.015)	23/371 (6.20 ± 0.013)	199 (53.64 ± 0.026)
	Overall	357 (46.85 ± 0.018)	93 (12.20 ± 0.012)	57 (7.48 ± 0.010)	393 (51.67 ± 0.018)
Madrid	Males	68/209 (32.54 ± 0.032)	24/209 (11.48 ± 0.022)	15/209 (7.18 ± 0.018)	77 (36.84 ± 0.033)
	Females	33/103 (32.04 ± 0.046)	20/103 (19.42 ± 0.039)	11/103 (10.68 ± 0.031)	42 (40.78 ± 0.049)
	Overall	101 (32.37 ± 0.027)	44 (14.10 ± 0.020)	26 (8.33 ± 0.016)	119 (38.14 ± 0.028)

(SE = Standard Error).

Regarding the goodness of the LR-binary model ( $\chi^2 = 372.93$ ;  $p < 0.0001$  and  $B = 0.098$  ( $SE = 0.038$ );  $p < 0.006$ ), age ( $p < 0.0001$ ), breed ( $p < 0.004$ ) and geographical location ( $p < 0.0001$ ) were significant, explaining between 0.155 (Cox and Snell's  $R^2$ ) and 0.207 (Nagelkerke's  $R^2$ ) of the dependent variable (seroprevalence), with 62.4% of the cases correctly classified. This indicates that the model is acceptable. Other risk factors, the coat colour and the gender, were not significant and fall out of the model (Tables S3 and S4 for *T. equi* and *B. caballi*, respectively, for details). The difference between average age of the positive and the negative horses (6.92 [95% CI: 6.61–7.22] subtracted from 8.19 [95% CI: 7.86–8.53]) by the *T. equi* IFAT test was 1.27 years. On the basis of these results, non-overlap between the CIs of the average ages supported statistically significant differences in the age of seropositivity, based on the IFAT test. Moreover, the OR values between a specific age and the previous one were slightly similar but significantly increased from three to 11 years of age. This was accompanied by a change of significance regarding the percentages in seroprevalence, reaching a threshold of around 44–65% of positivity from eleven years of age. Regarding the breed, OR values are significantly different among non-native breeds such as Arabian horses, Thoroughbred, Selle Français and crossbreeds, which always showed OR values higher than those from the autochthonous breeds like Spanish Pure Breed horses for *T. equi*. Focusing on the geographical distribution, it was observed that there was a higher risk of *T. equi* infection in Extremadura and Castilla-León since the OR was significant.

A similar result was obtained for *B. caballi*, since neither coat colour nor gender was risk factor for this parasitic infection. The difference between the average age for seronegative and seropositive horses was 1.75 years (7.14 [95% CI: 6.90–7.39], that is the mean age of seronegative horses, subtracted from 8.89 [95% CI: 8.31–9.57], that is the mean age of seropositive through the IFAT test). This difference was slightly higher than that for *T. equi*. The infection risk increased until 12 years of age; from there, the seropositivity settled around 20–45% and there were no significant

differences of seroprevalence above 12 years of age. However, the OR between a specific age group and the previous one for *B. caballi* was about three times higher than for *T. equi*, but turnover (more frequent negativity change to more frequent positivity) in favour of positivity from the nine-year threshold occurs only for *T. equi* (Table S3). There was a significant association between the breeds Arabian horses and Thoroughbred, and seropositivity for *B. caballi*. The seropositivity rate in Extremadura was significantly lower than in other regions.

#### IFAT vs. cELISA results

The concordance between the techniques was similar. Of the 108 tested sera samples, both diagnostic methods showed concordant results for *T. equi* in 91 sera (84.26%), meanwhile for *B. caballi* the same results were observed in 89 samples (82.41%). Focusing on the anti-*T. equi* antibodies, 7 sera were positive by IFAT but were found negative by the cELISA, and 10 serum samples were negative by IFAT but positive by cELISA. Analysing the *B. caballi* results, it was found that 16 horses had antibodies for that parasite by IFAT but did not show reactivity in the cELISA, and three animals were negative by IFAT but positive by cELISA (Table 2).

The concordance between the two serological methods for *T. equi* using the  $\kappa$  coefficient was 0.68. According to Landis and Koch's rating scale for the  $\kappa$  index, there was substantial agreement between the techniques. A fair agreement (Cohen's  $\kappa = 0.22$ ) was observed between the techniques for *B. caballi*.

#### Discussion

Equine piroplasmoses are diseases that affect a large number of horses worldwide. Spain is an enzootic zone; therefore, information about the prevalence of this infection in horse populations is essential to control the disease and to reduce the economic losses generated. Different serological tests are available for epidemiological studies (IFAT, cELISA) [56, 58]. Currently, both techniques are recommended by the World

**Table 2.** Serological results by IFAT and cELISA for *T. equi* (A) and *B. caballi* (B), respectively.

		cELISA		
		Positive	Negative	Total
<i>T. equi</i> (A)				
IFAT	Positive	48	7	55
	Negative	10	43	53
	Total	58	50	108
<i>B. caballi</i> (B)				
IFAT	Positive	4	16	20
	Negative	3	85	88
	Total	7	101	108

Organisation for Animal Health for importation [73]. This study mainly used the IFAT and 108 randomly selected samples were analysed using both methods. Importantly, survey samples were collected from a large area in Spain, which made it possible to estimate the overall prevalence in a more realistic manner. Several studies on the seroprevalence of EPs in Spain have been published, although most of them were not as extensive as the present survey. These diseases are widespread in Spain and seroprevalence is high, as it has been reported by other authors [21, 22, 35, 41, 43].

Recently, a survey carried out in all of Spain showed a *T. equi* seroprevalence of 21.9%, a prevalence of 5% for *B. caballi* and co-infection in 2.71% of the tested animals using the cELISA [22]. In the Andalusia region, García-Bocanegra et al. [35] reported a slightly higher seroprevalence for *T. equi* (48.6% vs. 43.61% in the present survey), but the *B. caballi* prevalence was 7.9% in the former, while in the present study it was 22.22%. In 2005, Camacho et al. [21] in Galicia (north-west Spain) estimated the seropositivity for *B. caballi* to be 28.3% in healthy horses using IFAT, which was similar to our results. The difference could be explained by variations in abiotic factors and tick fauna distribution. Furthermore, the particular results for *B. caballi* may also be explained by the use of different diagnostic techniques. Thus, in the present study, it was revealed that the agreement between the cELISA and the IFAT was poorer for *B. caballi*. This difference could be due to the fact that IFAT slides were made with an autochthonous strain, while the commercial cELISA kit used a *RAP-1* foreign antigen, leading to differences in the specificity and the sensitivity of the techniques. As we did, Camacho et al. [21] used the same IFAT technique, which led to a more accurate comparison among regions using the data from both studies. The prevalence estimated in other countries with IFAT or cELISA was different from the present survey. The EP prevalence was higher than in Spain in countries such as Colombia ( $\geq 90\%$ ) [98], Brazil 78.8% and 65.7% for *T. equi* and *B. caballi*, respectively, [44] or 97.5% for EP [100] and Mongolia with 82.3% EP seroprevalence [16], or 78.8% for *T. equi* and 65.7% for *B. caballi*, respectively [84]. However, it was lower in countries such as the UAE (33.3%) [48], Sudan (25.2%) [85], Portugal (17.9% and 11.1% for *T. equi* and *B. caballi*, respectively) [80], Turkey (18.4–18.5%) [51, 90], Jordan (14.6%) [2], Greece (11.6%) [56], Saudi Arabia (10.4% and 7.5% for *T. equi* and *B. caballi*, respectively) [6], Italy (8.5%) [40], Switzerland (7.3%) [92], the Netherlands

(4%) [19] and Korea (1.1%) [87]. In other studies, the *T. equi* seroprevalence was higher than that described in Spain, but the seropositivity for *B. caballi* was lower, this is the case for France (from 58% to 80% for *T. equi* and from 1.2% to 12.9% for *B. caballi*) [33, 38] and Iran (48% and 2%) [1]. Meanwhile, a lower prevalence of *T. equi* was described in Hungary (32%) [30], northern Italy (12.4%) [67] and the Azores Islands (9.1%) [11]. The EP seroprevalence discrepancies could be related to housing conditions, grazing and activity of horses [38, 56, 100]. Also, the measures for control of these diseases, the selected test for the diagnosis [2, 35, 56, 67], the climate and the tick fauna could be important. Thus, temperature and/or humidity and/or precipitation could increase or decrease tick populations [56, 94–96].

Using the IFAT, the *T. equi* seroprevalence was higher than that of *B. caballi*. Different trends were observed by other authors using different techniques (Table 3). *T. equi* was the predominant parasite in 82.14% of the studies in respect to *B. caballi*, but after excluding two studies [60, 81] due to discrepancies between diagnostic methods regarding the predominant haemoparasite.

Infected horses may remain lifelong carriers of *T. equi*, whereas *B. caballi* is eliminated from the bloodstream 1–4 years post-infection, which could explain the seroprevalence difference for these parasites [12, 28, 85]. This fact could explain why in horses older than nine years, the percentage of infected animals exceeds that of uninfected animals in the case of *T. equi*, which never occurs for *B. caballi*. Furthermore, treatments do not completely eliminate *T. equi* from the animals [18, 28]. The situation reported by other authors is different since *B. caballi* is more prevalent than *T. equi*, which has been related to the presence of the appropriate tick vectors for the transmission of *B. caballi* [69].

Several authors [4, 12, 35, 38, 45, 49, 50, 56, 70, 74, 77, 79, 84, 90, 100] suggested that age was a risk factor, since older animals could have been exposed to ticks for a longer period than young animals. Nevertheless, other authors showed the absence of an age-prevalence relationship [1, 3, 8, 10, 17, 23, 26, 36, 40, 46, 69, 75, 76, 80, 92, 94]. The present study pointed out that less than 1/4 of the foals and yearlings were seropositive for both parasites, with an increase in the percentage of infected horses until stabilisation at 11 and 14 years of age for *T. equi* and *B. caballi*, respectively, as Cantú-Martínez et al. reported [23]. Other studies have also reported that *T. equi* antibodies were higher in older than in young animals [8, 9, 27, 50, 51, 56]. In addition, Vieira et al. [100] indicate that the seroprevalence of *T. equi* increased with age but in contrast, the presence of antibodies to *B. caballi* decreased in the oldest animals, which resembles the pattern described in this study. There is evidence that animals infected with *T. equi* may become lifelong carriers [18]. However, infection with *B. caballi* may also persist in the subclinical state for 1–4 years only. This fact may partially explain our results, whereby *T. equi* seroprevalence remained over 60% from eleven years of age, but *B. caballi* seroprevalence did not exceed the level of 44% in 16-year-old horses in Spain, where these parasites cohabit.

It was found that Spanish breeds have a lower infection prevalence than non-native breeds. Sevinc et al. [90] and

**Table 3.** *T. equi* and *B. caballi* prevalence by different diagnostic methods, including geographical distribution and predominant parasite.

Diagnostic method	Continent	Country	Sample size	Prevalence in % ( <i>T. equi</i> vs. <i>B. caballi</i> )	Predominant parasite	References	
CFT	America	Brazil	582	28.5 and 54.6	<i>B. caballi</i> > <i>T. equi</i>	Kerber et al. 2009 [53]	
	Europe	France	443	58 and 12.9	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Guidi et al. 2015 [38]	
ELISA	Africa	Egypt	88	14.8 and 0	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Mahmoud et al. 2016 [62]	
		Sudan	158	63.5 and 4.4	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Salim et al. 2008 [85]	
	America	Brazil	47	81 and 90	<i>B. caballi</i> > <i>T. equi</i>	Xuan et al. 2001 [104]	
		Brazil	582	26.6 and 69.6	<i>B. caballi</i> > <i>T. equi</i>	Kerber et al. 2009 [53]	
		Brazil	198	78.3 and 69.2	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Vieira et al. 2003 [100]	
		Costa Rica	130	88.5 and 69.2	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Posada-Guzmán et al. 2015 [75]	
		Venezuela	360	50.3 and 70.5	<i>B. caballi</i> > <i>T. equi</i>	Mujica et al. 2011 [69]	
		Venezuela	694	14 and 23.2	<i>B. caballi</i> > <i>T. equi</i>	Rosales et al. 2013 [81]	
		Venezuela	70	40 and 24.3	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Xuan et al. 2002 [105]	
	Asia	China	111	34 and 32	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Xu et al. 2003 [103]	
		China	1990	11.51 and 51.16	<i>B. caballi</i> > <i>T. equi</i>	Wang et al. 2014 [101]	
		UAE	105	32.4 and 4.8	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Jaffer et al. 2010 [48]	
		India	180	75 and 1.11	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Sumbria et al. 2016 [96]	
		Japan	2019	2.2 and 5.4	<i>B. caballi</i> > <i>T. equi</i>	Ikadai et al. 2002 [47]	
		Jordan	253	14.6 and 0	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Abutarbush et al. 2012 [2]	
		Korea	184	1.1 and 0	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Seo et al. 2011 [87]	
		Mongolia	254	72.8 and 40.1	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Boldbaatar et al. 2005 [16]	
		Mongolia	250	51.6 and 19.6	<i>B. caballi</i> > <i>T. equi</i>	Munkhjargal et al. 2013 [70]	
		Pakistan	430	41.2 and 21.6	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Hussain et al. 2014 [46]	
	Europe	Thailand	240	5.42 and 2.5	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Kamyngkird et al. 2014 [50]	
		Turkey	481	16.21 and 0.83	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Sevinc et al. 2008 [90]	
		Turkey	220	56.8 and 0	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Kurt and Yaman 2012 [57]	
		Greece	524	9.2 and 1.1	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Kouam et al. 2010 [56]	
		Italy	673	39.8 and 8.9	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Bartolomé del Pino et al. 2016 [12]	
		Portugal	162	17.9 and 11.1	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Ribeiro et al. 2013 [80]	
		Spain	380	48.6 and 7.9	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	García-Bocanegra et al. 2013 [35]	
		Spain	1067	21.9 and 5	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Camino et al. 2016 [22]	
IFAT		Africa	Egypt	88	23.9 and 17.0	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Mahmoud et al. 2016 [62]
		South Africa	92	97.83 and 52.17	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Motloang et al. 2008 [68]	
		America	Brazil	93	33.3 and 68.8	<i>B. caballi</i> > <i>T. equi</i>	Asgarali et al. 2007 [8]
			Brazil	487	91.0 and 83	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Heim et al. 2007 [44]
	Asia	Mexico	248	45.2 and 27.4	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Cantú-Martínez et al. 2012 [23]	
		Iran	100	48 and 2	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Abedi et al. 2014 [1]	
		Saudi Arabia	241	10.4 and 7.5	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Alanazi et al. 2012 [6]	
		Thailand	240	8.75 and 5	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Kamyngkird et al. 2014 [50]	
	Europe	Turkey	110	64.5 and 4.5	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Akkan et al. 2003 [5]	
		Turkey	84	23.8 and 38	<i>B. caballi</i> > <i>T. equi</i>	Acici et al. 2008 [3]	
Turkey		125	12.8 and 9.6	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Karatepe et al. 2009 [51]		
UAE		105	33.3 and 10.5	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Jaffer et al. 2010 [48]		
Italy		412	12.4 and 17.9	<i>B. caballi</i> > <i>T. equi</i>	Moretti et al. 2010 [67]		
Italy		294	8.2 and 0.3	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Grandi et al. 2011 [40]		
Italy		300	41 and 26	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Laus et al. 2013 [60]		
Italy		1441	32.2 and 1.9	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Sgorbini et al. 2015 [89]		
Netherlands		300	1 and 3	<i>B. caballi</i> > <i>T. equi</i>	Butler et al. 2012 [19]		
Spain		60	40 and 28.3	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Camacho et al. 2005 [21]		
PCR	Africa	Spain	–	52.5 and 21.3	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Habela et al. 2005 [43]	
		Switzerland	689	4.4 and 1.5	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Sigg et al. 2010 [92]	
		Egypt	88	36.4 and 19.3	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Mahmoud et al. 2016 [62]	
		South Africa	92	5.43 and 0	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Motloang et al. 2008 [68]	
		Sudan	131	25.2 and 0	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Salim et al. 2008 [85]	
	America	Sudan	499	35.95 and 0	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Salim et al. 2013 [86]	
		Tunisia	104	11.54 and 0.96	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Ros-García et al. 2013 [82]	
		Brazil	487	59.7 and 12.5	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Heim et al. 2007 [44]	
		Costa Rica	130	46.2 and 20	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Posada-Guzmán et al. 2015 [75]	
		Guatemala	74	52 and 48	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Teglas et al. 2005 [97]	
Asia	Venezuela	136	61.8 and 4.4	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Rosales et al. 2013 [81]		
	India	180	14.14 and 0	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Sumbria et al. 2016 [96]		

(continued on next page)

Table 3. (continued)

Diagnostic method	Continent	Country	Sample size	Prevalence in % ( <i>T. equi</i> vs. <i>B. caballi</i> )	Predominant parasite	References
		Iran	100	45 and 0	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Abedi et al. 2014 [1]
		Iran	240	10.83 and 5.83	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Malekifard et al. 2014 [63]
		Jordan	288	18.8 and 7.3	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Qablan et al. 2013 [77]
		Korea	224	0.9 and 0	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Seo et al. 2013 [88]
		Turkey	200	7 and 3	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Güçlü and Karaer 2007 [37]
		Turkey	203	2.96 and 1.97	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Kizilarlan et al. 2015 [55]
		Turkey	125	8.8 and 0	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Guven et al. 2017 [39]
		Mongolia	192	92.7 and 1.2	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Sloboda et al. 2011 [93]
		Mongolia	250	6.4 and 42.4	<i>B. caballi</i> > <i>T. equi</i>	Mans et al. 2015 [64]
	Europe	Central Balkans	142	22.5 and 2.1	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Davitkov et al. 2016 [26]
		France	111	80 and 1.2	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Fritz 2010 [33]
		Italy	294	2.72 and 0	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Grandi et al. 2011 [40]
		Italy	300	6.0 and 11.7	<i>B. caballi</i> > <i>T. equi</i>	Laus et al. 2013 [60]
		Italy	263	70.3 and 10.3	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Bartolomé del Pino et al. 2016 [12]
		Romania	178	20.3 and 2.2	<i>T. equi</i> > <i>B. caballi</i>	Gallusová et al. 2014 [34]

Aharonson-Raz et al. [4] recognised that the seroprevalence in Arabian horses was higher, as also found in the present study, especially for *B. caballi*. Bartolomé del Pino et al. [12] indicated that the prevalence in crossbred horses was significantly higher than other (pure) breeds. Other surveys showed no association between infection prevalence and breed [2, 10, 36, 75].

Shkap et al. [91] considered that the differences in prevalence between male and female horses may be due to different management practices for the two sexes. In the present study, however, differences between male and female horses were not observed.

In contrast to Aharonson-Raz et al. [4], no significant association between coat colour and the results of the diagnostic test was observed. Further studies are needed to understand the origin of this difference.

Significantly higher seroprevalence was obtained only in Extremadura and Castilla-León horses. There have also been studies that demonstrated statistically significant differences between counties or regions [2, 3, 8, 12, 16, 26, 29, 35, 51, 52, 56, 87, 91, 94, 96].

With respect to Cohen's  $\kappa$  analysis, the concordance between the IFAT and the cELISA for *T. equi* was higher than for *B. caballi*, showing a fair agreement for *B. caballi*. The *EMA-1* gene of the strains used to make the *T. equi* recombinant antigen in the cELISA and the strains from Spain were probably similar. Consequently, for *B. caballi*, the different results between this technique and cELISA may be related to this fact. However, the *RAP-1* gene of strains used to make the recombinant antigen in the cELISA could be different from the *RAP-1* gene of Spanish strains. Recently, Montes et al. [66] showed one Spanish *B. caballi* strain to be genetically different from that described by Cacciò et al. [20] based on the  $\beta$ -tubulin gene. Also, the existence of genetic differences between strains within a country or among countries has been reported previously [14, 25, 71]. These authors showed that there was heterogeneity in the *18S rRNA* gene both for *T. equi* and *B. caballi* in Spain and South Africa. In support of our study and focusing on the *RAP-1* gene of *B. caballi*, Bhoora et al. [15], Rapoport et al. [79] and Mahmoud et al. [62] indicated failure

to detect the *B. caballi* parasite. In accordance with Rapoport et al. [79], there could be doubts as to the ability of the cELISA to serve as a sole regulatory test for the international horse trade. The IFAT used in the present survey was performed with Spanish *B. caballi* strains, since it appears that they detect the presence of haemoparasite antibodies more successfully than the cELISA. Thus, Kuttler et al. [59] and Prochno et al. [76] confirmed that, due to regional differences, the use of antigens from autochthonous strains provides the best results.

## Conclusions

The risk factors that seem to be associated with the presence of equine piroplasmoses in Spain are age, breed and geographical location. Meanwhile, coat colour and gender were not significantly associated in these diseases. The seroprevalence in young animals is relatively low, but as horses get older they become seropositive, especially concerning *T. equi*. In addition, the comparison between IFAT and cELISA revealed a possible underestimation of the presence of *B. caballi* when using cELISA.

## Conflict of interest

The authors declare there is no conflict of interest

**Acknowledgements.** The authors would like to thank the field veterinarians and the owners of the horses. They also thank Dr. Jacinto Garrido Velarde for his help with map design. Also we thank the "Junta de Extremadura, Consejería de Economía e Infraestructuras – Ayuda GR15085-; and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)/European Regional Development Fund (ERDF)".

## References

1. Abedi V, Razmi G, Seifi H, Naghibi A. 2014. Molecular and serological detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses and ixodid ticks in Iran. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5(3), 239–244.

2. Abutarbush SM, Alqawasmeh DM, Mukbel RM, Al-Majali AM. 2012. Equine babesiosis: Seroprevalence, risk factors and comparison of different diagnostic methods in Jordan. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(1), 72–78.
3. Acici M, Umur S, Givenc T, Arslan HH, Kurt M. 2008. Seroprevalence of equine babesiosis in the Black Sea region of Turkey. *Parasitology International*, 57(2), 198–200.
4. Aharonson-Raz K, Rapoport A, Hawari IM, Lensky IM, 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 and Tick-borne Diseases*, 5(4), 366–372.
5. Akkan HA, Karaca M, Tutuncu M, Deger S, Keles I, Agaoglu Z. 2003. Serologic and microscopic studies on babesiosis in horses in the eastern border of Turkey. *Journal of Equine Veterinary Sciences*, 5(23), 181–183.
6. Alanazi AD, Alyousif MS, Hassieb MM. 2012. Seroprevalence study on *Theileria equi* and *Babesia caballi* antibodies in horses from central province of Saudi Arabia. *Journal of Parasitology*, 98(5), 1015–1017.
7. Alhassan A, Pumidonming W, Okamura M, Hirata H, Battsetseg B, Fujisaki K, Yokoyama N, Igarashi I. 2005. Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. *Veterinary Parasitology*, 129(1–2), 43–49.
8. Asgarali Z, Coombs DK, Mohammed F, Campbell MD, Caesar E. 2007. A serological study of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in thoroughbreds in Trinidad. *Veterinary Parasitology*, 144(1–2), 167–171.
9. Ayala-Valdovinos MA, Lemus-Flores C, Galindo-García J, Bañuelos-Pineda J, Rodríguez-Carpena JG, Sánchez-Chiprés D, Duifhuis-Rivera T. 2017. Diagnosis and prevalence of *Theileria equi* in western Mexico by nested PCR. *Parasitology International*, 66, 821–824.
10. Bahrami S, Ghadrddan AR, Mirabdollahi SM, Fayed MR. 2014. Diagnosis of subclinical equine theileriosis in center of Iran using parasitological and molecular methods. *Tropical Biomedicine*, 31(1), 110–117.
11. Baptista C, Lopes MS, Tavares AC, Rojer H, Kappmeyer L, Mendoça D, da Câmara Machado A. 2013. Diagnosis of *Theileria equi* infections in horses in the Azores using cELISA and nested PCR. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 4(3), 242–245.
12. Bartolomé del Pino LE, Nardini R, Veneziano V, Iacoponi F, Cersini A, Autorino GL, Buono F, Sicluna MT. 2016. *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Central-Southern Italy: Sero-molecular survey and associated risk factors. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7, 462–469.
13. Bashiruddin JB, Cammà C, Rebelo E. 1999. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. *Veterinary Parasitology*, 84, 75–83.
14. Bhoora R, Franssen L, Oosthuizen MC, Guthrie AJ, Zwegarth E, Penzhorn BL, Jongejan F, Collins NE. 2009. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. *Veterinary Parasitology*, 159, 112–120.
15. Bhoora R, Quan M, Zwegarth E, Guthrie AJ, Prinsloo SA, Collins NE. 2010. Sequence heterogeneity in the gene encoding the rhoptry-associated protein-1 (RAP-1) of *Babesia caballi* isolates from South Africa. *Veterinary Parasitology*, 169(3–4), 279–288.
16. Boldbaatar D, Xuan X, Battsetseg B, Igarashi I, Battur B, Batsukh Z, Bayambaa B, Fujisaki K. 2005. Epidemiological study of equine piroplasmiasis in Mongolia. *Veterinary Parasitology*, 127(1), 29–32.
17. Botteon PTL, Massard CL, Botteon RCCM, Loss ZG, Linhares GFC. 2002. Seroprevalence of *Babesia equi* in three breeding systems of equines. Rio de Janeiro-Brazil. *Parasitologia Latinoamericana*, 57(3–4), 141–145.
18. Brüning A. 1996. Equine piroplasmiasis: an update on diagnosis, treatment and prevention. *British Veterinary Journal*, 152(2), 139–151.
19. Butler CM, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Stout TAE, van der Kolk JH, Lv Wollenberg, Nielsen M, Jongejan F, Werners AH, Houwers DJ. 2012. Prevalence of the causative agents of equine piroplasmiasis in the South West of The Netherlands and the identification of two autochthonous clinical *Theileria equi* infections. *The Veterinary Journal*, 193(2), 381–385.
20. Cacciò S, Cammà C, Onuma M, Severini C. 2000. The beta-tubulin gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is an informative marker for species discrimination. *International Journal for Parasitology*, 30, 1181–1185.
21. Camacho AT, Guitian FJ, Pallas E, Gestal JJ, Olmeda AS, Habela MA, Telford SR III, Spielman A. 2005. *Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain. *Tropical Animal Health and Production*, 37(4), 293–302.
22. Camino E, Carvajal KA, Lozano FJ, Viñolo C, Alende T, Domínguez L, Cruz F. 2016. Estudio de seroprevalencia de piroplasmiasis equina en España en muestras previas a la exportación. XXI Simposio Anual Avedilla, Murcia.
23. Cantú-Martínez MA, Segura-Correa JC, Silva-Páez ML, Avalos-Ramírez R, Wagner GG. 2012. Prevalence of antibodies to *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from Northeastern Mexico. *Journal of Parasitology*, 98(4), 869–870.
24. Cohen J. 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*, 20, 37–46.
25. Criado-Fornelio A, González-del-Río MA, Buling-Saraña A, Barba-Carretero JC. 2004. The “expanding universe” of piroplasms. *Veterinary Parasitology*, 119(4), 337–345.
26. 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 Parasitologica*, 61(2), 337–342.
27. De Campos CHC, Prado RFS, Guimãraes A, da Silva AT, Baldani CD, Cordeiro MD, Pires MS, Peixoto MP, dos Santos HA, Machado RZ, Fonseca AH, Massard CL. 2013. Aspectos epidemiológicos e soroprevalência de *Theileria equi* em equinos de uso military no município de Resende, estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(S2), 106–112.
28. De Waal DT, Van Heerden J. 1994. Equine Piroplasmiasis, in *Infectious Diseases of Livestock*, Coetzer JAW, Tustin RC, Editors. Oxford University Press: New York. p. 295–304.
29. Dos Santos TM, Roier EC, dos Santos HA, Pires MS, Vilela JA, Moraes LM, Almeida FQ, Baldani CD, Machado RZ, Massard CL. 2011. Factors associated to *Theileria equi* in equids of two microregions from Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 20(3), 235–241.
30. Farkas R, Tanczos B, Gyurkovszky M, Fölsvári G, Solymosi N, Edelhofer R, Hornok S. 2013. Serological and molecular detection of *Theileria equi* infection in horses in Hungary. *Veterinary Parasitology*, 192, 143–148.

31. Friedhoff KT, Tenter AM, Müller I. 1990. Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. *Revue Scientifique et Technique Office International des Épizooties*, 9(4), 1187–1194.
32. Friedhoff KT, Soulé C. 1996. An account on equine babesiosis. *Revue Scientifique et Technique Office International des Épizooties*, 15, 1191–1201.
33. Fritz D. 2010. A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008). *Parasitology Research*, 106(6), 1339–1342.
34. Gallusová M, Qablan MA, D'Amico G, Oborník M, Petrzelková KJ, Mihalca AD, Modrý D. 2014. Piroplasms in feral and domestic equines in rural areas of the Danube Delta, Romania, with survey of dogs as a possible reservoir. *Veterinary Parasitology*, 206(3–4), 287–292.
35. García-Bocanegra I, Arenas-Montes A, Hernández E, Adaszek L, Carbonero A, Almería S, Jaén-Téllez JA, Gutiérrez-Palomino P, Arenas A. 2013. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. *Veterinary Journal*, 195(2), 172–178.
36. Golynski AA, Fernandes KR, Baldani CD, Golynski AL, Madeiro AS, Machado RZ, Botteon P de T, Massard CL. 2008. Seroepidemiological studies on *Babesia equi* in horses from the State of Rio Grande do Sul determined by indirect immunofluorescence test and Elisa. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(S1), 317–321.
37. Güçlü HZ, Karaer KZ. 2007. Detection of *Babesia caballi* (Nuttall, 1910) and *Theileria equi* (Syn. *Babesia equi*, Laveran, 1901) by the polymerase chain reaction (PCR) in show and sport horses in the region of Ankara. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 31(2), 89–93.
38. Guidi E, Pradier S, Lebert I, Leblond A. 2015. Piroplasmiasis in an endemic area: analysis of the risk factors and their implications in the control of theileriosis and babesiosis in horses. *Parasitology Research*, 114(1), 71–83.
39. Guven E, Avcioglu H, Deniz A, Balkaya İ, Abay U, Yavuz Ş, Akyüz M. 2017. Prevalence and molecular characterization of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in jereed horses in Erzurum, Turkey. *Acta Parasitologica*, 62(1), 207–213.
40. Grandi G, Molinari G, Tittarelli M, Sasseria D, Kramer LH. 2011. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses from Northern Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(7), 955–956.
41. Habela M, Reina D, Nieto D, Verdugo SG, Navarrete I. 1989. Epidemiología de la babesiosis equina en Extremadura: estudio preliminar. *Medicina Veterinaria*, 6, 31–39.
42. Habela M, Grande A, Antón JM, Mora JA, Moreno F, Pérez-Martín JE. 1995. Aportaciones al conocimiento de la distribución y clínica de la babesiosis equina en España. IV Congreso Ibérico de Parasitología, Santiago de Compostela.
43. Habela MA, Gragera-Slikker A, Moreno A, Montes G, Sevilla R. 2005. Piroplasmiasis equina: conocimiento y grado de concienciación de los productores de caballos Pura Raza Española. *Revista Equinus*, 11, 17–34.
44. Heim A, Passos LM, Ribeiro MF, Costa-Júnior LM, Bastos CV, Cabral DD, Hirzmann J, Pfister K. 2007. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. *Parasitology Research*, 102(1), 63–68.
45. Heuchert CM, de Guilli V, de Athaide DF, Böse R, Friedhoff KT. 1999. Seroepidemiologic studies on *Babesia caballi* infections in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 85, 1–11.
46. Hussain MH, Saqib M, Raza F, Muhammad G, Asi MN, Mansoor MK, Saleem M, Jabbar A. 2014. Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in five draught equine populated metropolises of Punjab, Pakistan. *Veterinary Parasitology*, 202(3–4), 248–256.
47. Ikadai H, Nagai A, Xuan X, Igarashi I, Kamio T, Tsuji N, Oyamada T, Suzuki N, Fujisaki K. 2002. Seroepidemiologic studies on *Babesia caballi* and *Babesia equi* infections in Japan. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 64(4), 325–328.
48. Jaffer O, Abdishakur F, Hakimuddin F, Riya A, Wernery U, Schuster RK. 2010. A comparative study of serological tests and PCR for the diagnosis of equine piroplasmiasis. *Parasitology Research*, 106(3), 709–713.
49. Javed K, Ijaz M, Ali MM, Khan I, Mehmood K, Ali S. 2014. Prevalence and hematology of tick borne hemoparasitic diseases in Equines in and around Lahore, Pakistan. *Journal of Zoology*, 46(2), 401–408.
50. Kamyngkird K, Yangtara S, Desquesnes M, Cao S, Adjou PK, Jittapalpong S, Nimsupan B, Terkawi MA, Masatani T, Nishikawa Y, Igarashi I, Xuan X. 2014. Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses and mules from Northern Thailand. *Journal of Protozoology Research*, 24, 11–17.
51. Karatepe B, Karatepe M, Cakmak A, Karaer Z, Ergün G. 2009. Investigation of seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Nigde province, Turkey. *Tropical Animal Health and Production*, 41(1), 109–113.
52. Kerber CE, Ferreira F, Pereira MC. 1999. Control of equine piroplasmiasis in Brazil. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 66, 123–127.
53. Kerber CE, Labruna MB, Ferreira F, De Waal DT, Knowles DP, Gennari SM. 2009. Prevalence of equine Piroplasmiasis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18(4), 1–8.
54. Kim C, Conza LB, 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. *Veterinary Parasitology*, 151, 158–163.
55. Kizilarlan F, Yildirim A, Duzlu O, Inci A, Onder Z, Ciloglu A. 2015. Molecular detection and characterization of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses (*Equus ferus caballus*) in Turkey. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35, 830–835.
56. Kouam MK, Kantzoura V, Gajadhar AA, Theis JH, Papadopoulos E, Theodoropoulos G. 2010. Seroprevalence of equine piroplasms and host-related factors associated with infection in Greece. *Veterinary Parasitology*, 169(3–4), 273–278.
57. Kurt C, Yaman M. 2012. The investigation of the prevalence of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horses by microscopic and serologic (cELISA) methods in Adana Province. *Yüzüncü yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23(1), 1–4.
58. Kuttler KL. 1988. World-Wide impact of babesiosis, in Babesiosis of domestic animals and man. Ristic M, Editor. CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 1–22.
59. Kuttler KL, Goff WL, Gipson CA, Blackburn BO. 1988. Serologic response of *Babesia equi* infected horses as measured by complement-fixation and indirect fluorescent antibody tests. *Veterinary Parasitology*, 26(3–4), 199–205.
60. Laus F, Veronesi F, Passamonti F, Paggi E, Cerquetella M, Hyatt D, Tesi B, Fioretti DP. 2013. Prevalence of tick borne pathogens in horses from Italy. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 75(6), 715–720.

61. MAGRAMA. 2013. [http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicossectorequino2015\\_tcm7-386080.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicossectorequino2015_tcm7-386080.pdf) (accessed 27 February 2017).
62. Mahmoud MS, El-Ezz NT, Abdel-Shafy S, Nassar SA, El Namaky AH, Khalil WK, Knowles D, Kappmeyer L, Silva MG, Suarez CE. 2016. Assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in equine populations in Egypt by molecular, serological and haematological approaches. *Parasites and Vectors*, 9(1), 260.
63. 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. *Veterinary Research Forum*, 5(2), 129–133.
64. Mans BJ, Pienaar R, Latif AA. 2015. A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. *International Journal for Parasitology*, 4, 104–118.
65. Mehlhorn H, Schein E. 1998. Redescription of *Babesia equi* (Laveran, 1901) as *Theileria equi* (Mehlhorn, Schein 1998). *Parasitology Research*, 84, 467–475.
66. Montes MG, Fernández-García JL, Habela MA. in press. Genetic variation of the beta-tubulin gene of *Babesia caballi* strains. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*.
67. Moretti A, Mangili V, Salvatori R, Maresca C, Scoccia E, Torina A, Moretta I, Gabrielli S, Tampieri MP, Pietrobelli M. 2010. Prevalence and diagnosis of *Babesia* and *Theileria* infections in horses in Italy: a preliminary study. *Veterinary Journal*, 184(3), 346–350.
68. Motloang MY, Thekisoe OMM, Alhassan A, Bakheit M, Motheo MP, Masangane FES, Thibedi ML, Inoue N, Igarashi I, Sugimoto C, Mbatia PA. 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 Journal of Veterinary Research*, 75, 141–146.
69. Mujica FF, Perrone T, Forlano M, Coronado A, Meléndez RD, Barrios N, Álvarez R, Granda F. 2011. Serological prevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses of Lara State, Venezuela. *Veterinary Parasitology*, 178(1–2), 180–183.
70. Munkhjargal T, Sivakumar T, Battsetseg B, Nyamjargal T, Aboulaila M, Purevtseren B, Bayarsaikhan D, Byambaa B, Terkawi MA, Yokoyama N, Igarashi I. 2013. Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province, Mongolia. *Infection, Genetics and Evolution*, 16, 178–185.
71. Nagore D, García-Sanmartín J, García-Pérez AL, Juste RA, Hurtado A. 2004. Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: epidemiological Survey and phylogenetic analysis. *Veterinary Parasitology*, 123(1–2), 41–54.
72. Nicolaiewsky TB, Richter MF, Lunge VR, Cuhna CW, Delagostin O, Ikuta N, Fonseca AS, Silva SS, Ozaki LS. 2001. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*, 101, 9–21.
73. OIE. 2017. Equine piroplasmosis, in *Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals*, [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahc/current/chapitre\\_equine\\_piroplasmosis.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_equine_piroplasmosis.pdf) (accessed 20 February 2017) (Chapter 12.7).
74. Olivera M, García F. 2001. Equine babesiosis seroprevalence in thoroughbred racing horse farms from Aragua and Carabobo State, Venezuela. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela*, 42(1–2), 3–13.
75. Posada-Guzmán MF, Dolz G, Romero-Zúñiga JJ, Jiménez-Rocha AE. 2015. Detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in blood from equines from four indigenous communities in Costa Rica. *Veterinary Medicine International*, 2015, 236278.
76. Prochno HC, Scorsin LM, De Melo FR, Baldani CD, Falbo MK, de Aquino LC, Lemos KR. 2014. Seroprevalence rates of antibodies against *Theileria equi* in team roping horses from central-western region of Paraná. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(1), 85–89.
77. Qablan MA, Obrník M, Petrželková KJ, Sloboda M, Shudiefat MF, Hořín P, Lukeš J, Modrý D. 2013. Infections by *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Jordanian equids: epidemiology and genetic diversity. *Parasitology*, 140(9), 1096–1103.
78. Rampersad J, Cesar E, Campbell MD, Samlal M, Ammons D. 2003. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. *Veterinary Parasitology*, 114, 81–87.
79. 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. *Infection, Genetics and Evolution*, 23, 115–120.
80. Ribeiro AJ, Cardoso L, Maia JM, Coutinho T, Cotovio M. 2013. Prevalence of *Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Anaplasma phagocytophilum* in horses from the north of Portugal. *Parasitology Research*, 112(7), 2611–2617.
81. Rosales R, Rangel-Rivas A, Escalona A, Jordan LS, Gonzatti MI, Asom PM, 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. *Veterinary Parasitology*, 196(1–2), 37–43.
82. Ros-García A, M'ghirbi Y, Hurtado A, Bouattour A. 2013. Prevalence and genetic diversity of piroplasms species in horses and ticks from Tunisia. *Infection, Genetics and Evolution*, 17, 33–37.
83. Rothschild CM, Knowles DP. 2007. Equine Piroplasmosis, in *Equine Infectious Diseases*. Sello DC, Long MT, Editors. Saunders Elsevier: St. Louis, MO. p. 465–473.
84. Rüegg SR, 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(Pt 7), 939–947.
85. Salim BOM, Hassan SM, Bakheit MA, Alhassan A, Igarashi I, Karanis P, Abdelrahman MB. 2008. Diagnosis of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Sudan using ELISA and PCR. *Parasitology Research*, 103(5), 1145–1150.
86. Salim B, Bakheit MA, Kamau J, Sugimoto C. 2013. Current status of equine piroplasms in the Sudan. *Infection, Genetics and Evolution*, 16, 191–199.
87. Seo MG, Yun SH, Choi SK, Cho GJ, Park YS, Kwon OD, Cho KH, Kim TH, Jeong KS, Park SJ, Kwon YS, Kwak D. 2011. Seroprevalence of equine piroplasms in the Republic of Korea. *Veterinary Parasitology*, 179(1–3), 224–226.
88. Seo MG, Yun SH, Choi SK, Cho GJ, Park YS, Cho KH, Kwon OD, Kwak D. 2013. Molecular and phylogenetic analysis of equine piroplasms in the Republic of Korea. *Research in Veterinary Science*, 94, 579–583.
89. Sgorbini M, Bonelli F, Nardoni S, Rocchigiani G, Corazza M, Mancianti F. 2015. Seroprevalence and molecular analysis of *Babesia caballi* and *Theileria equi* from Central Italy during a 10-year period. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35, 865–868.

90. Sevinc F, Maden M, Kumas C, Sevinc M, Ekici OD. 2008. A comparative study on the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horse sub-populations in Turkey. *Veterinary Parasitology*, 156(3–4), 173–177.
91. 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. *Veterinary Parasitology*, 76(4), 251–259.
92. Sigg L, Gerber V, Gottstein B, Doherr MG, Frey CF. 2010. Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in the Swiss horse population. *Parasitology International*, 59(3), 313–317.
93. Sloboda M, Jirků M, Lukešová D, Qablan M, Batsukh Z, Fiala I, Hořin P, Modrý M, Lukeš J. 2011. A survey for piroplasmids in horses and Bactrian camels in North-Eastern Mongolia. *Veterinary Parasitology*, 179(1–3), 246–249.
94. Steinman A, Zimmerman T, Klement E, Lensky IM, Berlin D, Gottlieb Y, Baneth G. 2012. Demographic and environmental risk factors for infection by *Theileria equi* in 590 horses in Israel. *Veterinary Parasitology*, 187(3–4), 558–562.
95. Sumbria D, Singla LD, Kumar S, Sharma A, Dahiya RK, Setia R. 2016a. 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 Tropica*, 155, 104–112.
96. Sumbria D, Singla LD, Sharma A. 2016. *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in equids in Punjab, India: a serological and molecular survey. *Tropical Animal Health and Production*, 48(1), 45–52.
97. Teglas M, Matern E, Lein S, Foley P, Mahan SM, Foley J. 2005. Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. *Veterinary Parasitology*, 131(1–2), 119–127.
98. Tenter AM, Otte MJ, Gonzalez CA, Abuabara Y. 1988. Prevalence of piroplasmosis in equines in the Colombian province of Cordoba. *Tropical Animal Health and Production*, 20(2), 93–98.
99. Thrusfield M, Ortega C, de Blas I, Noordhuizen JP, Frankena K. 2001. Win Episcope 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Veterinary Record*, 148(18), 567–572.
100. Vieira TS, Vieira RF, Finger MA, Nascimento DA, Sicupira PM, Dutra LH, Deconto I, Barros-Filho IR, Dornbusch PT, Biondo AW, Vidotto O. 2013. Seroepidemiological survey of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from a rural and from urban areas of Paraná State, southern Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4(6), 537–541.
101. 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. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 76(4), 549–552.
102. Wise LN, Kappmeyer LS, Mealey RH, Knowles DP. 2013. Review of equine piroplasmosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27, 1334–1346.
103. Xu Y, Zhang S, Huang X, Bayin C, Xuan X, Igarashi I, Fujisaki K, Kabeya H, Maruyama S, Mikami T. 2003. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Jilin province of China. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 65(9), 1015–1017.
104. Xuan X, Nagai A, Battsetseg B, Fukumoto S, Makala LH, Inoue N, Igarashi I, Mikami T, Fujisaki K. 2001. Diagnosis of equine piroplasmosis in Brazil by serodiagnostic methods with recombinant antigens. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 63(10), 1159–1160.
105. Xuan X, Chahan B, Huang X, Yokohama N, Makala LH, Igarashi I, Fujisaki K, Maruyama S, Sakai T, Mikami T. 2002. Diagnosis of equine piroplasmosis in Xinjiang province of China by the enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant antigens. *Veterinary Parasitology*, 108(2), 179–182.

**Cite this article as:** Montes Cortés MG, Fernández-García JL & Habela Martínez-Estélez MÁ: Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Spain. *Parasite*, 2017, 24, 14.

## PARASITE

An international open-access, peer-reviewed, online journal publishing high quality papers on all aspects of human and animal parasitology

Reviews, articles and short notes may be submitted. Fields include, but are not limited to: general, medical and veterinary parasitology; morphology, including ultrastructure; parasite systematics, including entomology, acarology, helminthology and protistology, and molecular analyses; molecular biology and biochemistry; immunology of parasitic diseases; host-parasite relationships; ecology and life history of parasites; epidemiology; therapeutics; new diagnostic tools.

All papers in Parasite are published in English. Manuscripts should have a broad interest and must not have been published or submitted elsewhere. No limit is imposed on the length of manuscripts.

**Parasite** (open-access) continues **Parasite** (print and online editions, 1994-2012) and **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée** (1923-1993) and is the official journal of the Société Française de Parasitologie.

Editor-in-Chief:  
Jean-Lou Justine, Paris

Submit your manuscript at  
<http://parasite.edmgr.com/>



Material adicional de la publicación «**Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Spain**». También se puede consultar en la página web de la revista internacional Parasite.

**Table S1** Horse populations of regions studied and number of collected samples

<b>Region</b>	<b>Horse Population</b>	<b>Number Collected Samples</b>
Andalusia	220,809	954
Castilla-León	65,549	690
Extremadura	44,053	762
Castilla-La Mancha	26,227	382
Madrid	18,909	312

**Table S2** Equine Piroplasmosis Seroprevalence by provinces

<b>Region</b>	<b>Province</b>	<b>Number of serum samples</b>	<b>Overall seroprevalence (%)</b>	<b>Number positives (%) <i>T. equi</i></b>	<b>Number positives (%) <i>B. caballi</i></b>
<b>Andalusia</b>					
	Almería	6	50	3 (50.0)	1 (16.67)
	Cádiz	277	57.04	125 (45.13)	79 (28.52)
	Córdoba	4	51.11	17 (37.78)	13 (28.89)
	Granada	52	28.85	15 (28.85)	3 (5.77)
	Huelva	51	37.25	17 (33.33)	9 (17.65)
	Málaga	158	48.73	70 (44.30)	29 (18.35)
	Sevilla	365	52.60	169 (46.30)	78 (21.37)
<b>Castilla-La Mancha</b>					
	Ciudad-Real	16	87.50	14 (87.50)	2 (12.50)
	Guadalajara	15	73.33	8 (53.33)	3 (20.00)
	Toledo	351	66.38	217 (61.82)	74 (21.08)
<b>Castilla-León</b>					
	Ávila	54	66.67	30 (55.55)	17 (31.48)
	Burgos	37	62.16	19 (51.35)	19 (51.35)
	León	176	36.93	39 (22.16)	36 (20.45)
	Palencia	13	38.46	4 (30.77)	5 (38.46)
	Salamanca	92	51.09	34 (36.96)	30 (32.61)
	Segovia	87	83.91	52 (59.77)	42 (48.28)
	Valladolid	129	51.16	50 (38.76)	36 (27.91)
	Zamora	102	53.92	40 (39.22)	30 (29.41)
<b>Extremadura</b>					
	Badajoz	417	44.36	159 (38.13)	40 (9.59)
	Cáceres	345	60.29	198 (57.39)	53 (15.36)
<b>Madrid</b>					
	Madrid	312	38.14	101 (32.37)	44 (14.10)

**Table S3** Variables on the Logistic Regression for the *T. equi* IFAT

Qualitative variable	Negative horses	Positive horses	<i>p</i> -value	OR		
	(%)	(%)		95.0%	IC	
<b>AGE</b>						
≤ 1 year	160 (73.39)	58(26.61)		1		
2 years	121(55.25)	98(44.75)	.000	.064	.021	.202
3 years	158 (59.85)	106 (40.15)	.001	.156	.051	.479
4 years	128 (62.14)	78 (37.86)	.000	.130	.043	.395
5 years	78 (54.17)	66 (45.83)	.000	.111	.036	.338
6 years	93 (53.76)	80 (46.24)	.000	.112	.036	.348
7 years	93(55.36)	75 (44.64)	.001	.150	.049	.463
8 years	86 (53.75)	74 (46.25)	.002	.164	.053	.504
9 years	47 (47.96)	51 (52.04)	.001	.148	.048	.460
10 years	44 (47.31)	49 (52.69)	.002	.158	.049	.508
11 years	28 (39.44)	43 (60.56)	.021	.247	.075	.812
12 years	42 (47.73)	46 (52.27)	.075	NS		
13 years	12 (34.29)	23 (65.71)	.004	.171	.052	.561
14 years	22 (43.14)	29 (56.86)	.222	NS		
15 years	16 (34.78)	30 (65.22)	.009	.187	.053	.653
16 years	17 (37.78)	28 (62.22)	.243	NS		
17 years	11 (42.31)	15 (57.69)	.231	NS		
18 years	6 (40.00)	9 (60.00)	.013	.159	.037	.681
19 years	6 (42.86)	8 (57.14)	.915	NS		
≥ 20years	103 (55.98)	81 (44.02)	.916	NS		
<b>BREED</b>						
Purebred Spanish Horse	718 (55.53)	575 (44.47)		1		
Cross-bred	167 (38.57)	266 (61.43)	.014	4.310	1.34	13.862
Arabian horse	19 (44.19)	24 (55.81)	.000	8.894	2.73	28.935
Thoroughbred	19 (48.72)	20 (51.28)	.047	4.030	1.02	15.930
Selle Français	15 (60.00)	10 (40.00)	.021	5.022	1.27	19.808
Lusitano	4 (26.67)	11 (73.33)	.022	7.399	1.33	41.011
Hanoverian Horse	6 (85.71)	1 (14.29)	.000	20.01	3.79	105.53
Spanish Sport Horse	1 (11.11)	8 (88.89)	.535	NS		
Other	25 (83.33)	5 (16.67)	.999	NS		
<b>COAT COLOUR</b>						
Chestnut	76 (53.52)	66 (46.48)		1		
Dapple-Grey	490 (49.49)	500 (50.51)	.364	NS		
Dark Brown	222 (48.79)	233 (51.21)	.065	NS		
Black	124 (65.61)	65 (34.39)	.102	NS		
Other	15 (68.18)	7 (31.82)	.226	NS		

**Table S3 (Continued)**

<b>GENDER</b>							
Female	694 (53.02)	615 (46.98)		1			
Male	1025 (57.23)	766 (42.77)	.059	NS			
<b>REGION</b>							
Andalusia	538 (56.39)	416 (43.61)		1			
Castilla-La Mancha	143 (37.43)	239 (62.57)	.273	NS			
Castilla-León	422 (61.16)	268 (38.84)	.004	3.306	1.46	7.470	
Extremadura	405 (53.15)	357 (46.85)	.028	2.625	1.11	6.209	
Madrid	211 (67.63)	101 (32.37)	.181	NS			

OR, Odds ratio; 95.0% IC, 95% confidence interval. 1= Reference category. *p*-value= when < 0.05 significant. NS= No significant.

**Table S4** Variables on the Logistic Regression for the *B. caballi* IFAT

Qualitative variable	Negative horses	Positive horses	<i>p</i> -value	OR		
	(%)	(%)		95.0%	I.C.	
<b>AGE</b>						
≤ 1 year	193 (88.53)	25 (11.47)		1		
2 years	160 (73.06)	59 (26.94)	.000	.255	.152	.427
3 years	211 (79.92)	53 (20.08)	.141	NS		
4 years	179 (86.89)	27 (13.11)	.001	.494	.322	.759
5 years	115 (79.86)	29 (20.14)	.000	.297	.179	.493
6 years	149 (86.13)	24(13.87)	.007	.496	.298	.826
7 years	145 (86.31)	23 (13.69)	.000	.317	.187	.538
8 years	134 (83.75)	26 (16.25)	.000	.312	.183	.533
9 years	87 (88.78)	11 (11.22)	.000	.382	.227	.642
10 years	75 (80.65)	18 (19.35)	.000	.249	.124	.500
11 years	57 (80.28)	14 (19.72)	.014	.472	.260	.859
12 years	68 (77.27)	20 (22.73)	.031	.483	.250	.935
13 years	27 (77.14)	8 (22.86)	.067	NS		
14 years	33 (64.71)	18 (35.29)	.211	NS		
15 years	32 (69.57)	14 (30.43)	.831	NS		
16 years	25 (55.56)	20 (44.44)	.674	NS		
17 years	17 (65.38)	9 (34.62)	.180	NS		
18 years	12 (80.00)	3 (20.00)	.926	NS		
19 years	10 (71.43)	4 (28.57)	.285	NS		
≥ 20years	122 (66.30)	62 (33.70)	.696	NS		
<b>BREED</b>						
Purebred Spanish Horse	1082 (83.68)	211 (16.32)		1		
Cross-bred	326 (75.29)	107 (24.71)	.074	NS		
Arabian horse	30 (69.77)	13 (30.23)	.008	8.350	1.74	39.942
Thoroughbred	32 (82.05)	7 (17.95)	.035	6.651	1.14	38.614
Selle Français	23 (92.00)	2 (8.00)	.083	NS		
Lusitano	7 (46.67)	8 (53.33)	.198	NS		
Hanoverian Horse	6 (85.71)	1 (14.29)	.000	49.189	7.21	335.46
Spanish Sport Horse	8 (88.89)	1 (11.11)	.225	NS		
Other	27 (90.00)	3 (10.00)	.242	NS		
<b>COAT COLOUR</b>						
Chestnut	95 (66.90)	47 (33.10)		1		
Dapple –Grey	802 (81.01)	188 (18.99)	.051	NS		
Dark Brown	388 (85.27)	67 (14.73)	.235	NS		
Black	166 (87.83)	23 (12.17)	.504	NS		
Other	19 (86.36)	3 (13.64)	.513	NS		

**Table S4** (Continued)

<b>GENDER</b>						
Female	1028 (78.53)	281(21.47)		1		
Male	1429 (79.79)	362 (20.21)	.687	NS		
<b>REGION</b>						
Andalusia	742 (77.78)	212 (22.22)		1		
Castilla-La Mancha	303 (79.32)	79 (20.68)	.161	NS		
Castilla-León	475 (68.84)	215 (31.16)	.522	NS		
Extremadura	669 (87.80)	93 (12.20)	.005	3.979	1.52	10.413
Madrid	268 (85.90)	44 (14.10)	.513	NS		

OR, Odds ratio; 95.0% IC, 95% confidence interval. 1= Reference category. *p*-value= when < 0.05 significant. NS= No significant.

### 3.3.- Estudio III

#### «A multinested-PCR for detection of the equine piroplasmids *Babesia caballi* and *Theileria equi*»

«Una PCR múltiple anidada para la detección de los piroplásmidos equinos *Babesia caballi* y *Theileria equi*»

**M<sup>a</sup> Guadalupe Montes Cortés<sup>1</sup>**, José Luis Fernández-García<sup>2</sup>, Miguel Ángel Habela Martínez-Estélez<sup>1</sup>

1.- Área de Parasitología. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria de Cáceres, España.

2.- Área de Producción Animal. Departamento de Producción Animal y Ciencia de los alimentos. Facultad de Veterinaria de Cáceres, España.

**Tick and Tick-Borne Diseases** DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.008>

Artículo aceptado el día 10 de noviembre y publicado online el 13 de noviembre de 2018 (ver anexo III)

**Factor de impacto JCR actual (2017): 2,612**

**Este artículo no está publicado en acceso abierto**

#### Abstract

Two haemoparasites, *Theileria equi* and *Babesia caballi*, cause equine piroplasmiasis (EP), one of the most prevalent tick-borne diseases in horses. The main aim of the present study was to develop and evaluate a multinested PCR (mn-PCR) for simultaneous detection of the equine piroplasmids *T. equi* and *B. caballi*, by amplification of five genetic markers (*18S rRNA*, *β-tubulin*, *cytB*, *EMA-1* and *RAP-1*). This novel assay detected a high prevalence of equine piroplasmids in 235 horse blood samples collected in Castilla-León and Extremadura, Spain. The overall prevalence of infection with equine piroplasmids by mn-PCR was 72.8% (171/235), with 66.0% (155/235) of the animals for *T. equi* and 29.4% (69/235) positive for *B. caballi*. The seroprevalence obtained by cELISA for the same set of samples was lower than the infection prevalence recorded by mn-PCR, for either of the two equine piroplasmids (62.6%) as well as for *T. equi* alone (61.7%) or *B. caballi* alone (3.8%). There was high agreement among the mn-PCR and cELISA assays for diagnosis of EP caused by *T. equi* ( $\kappa=0.83$ ) but not for *B. caballi* ( $\kappa=0.06$ ). A phylogenetic analysis based on the *RAP-1* gene of *B. caballi* showed that the strains from Spain clustered with those from Israel.

### Resumen

Son dos hemoparásitos, *Babesia caballi* y *Theileria equi*, los que causan la Piroplasmosis Equina (PE), una de las enfermedades transmitidas por garraparas más prevalente en los caballos. El objetivo principal de este estudio fue desarrollar y evaluar una PCR múltiple y anidada (mn-PCR) para la detección simultánea de los piroplásmidos equinos *B. caballi* y *T. equi*, mediante la amplificación de fragmentos de cinco genes (*18S rRNA*, *β-tubulina*, *cytB*, *EMA-1* y *RAP-1*).

Esta nueva técnica detectó una alta prevalencia de estos parásitos en 235 muestras de sangres de caballos recogidas en Castilla y León y Extremadura, ambas regiones de España. La prevalencia total mostrada por la mn-PCR fue del 72,8% (171/235), siendo un 66,0% (155/235) de los animales positivos a *T. equi*, un 29,4% (69/235) positivos a *B. caballi* y un 22,6% (53/235) positivos a ambos parásitos. La seroprevalencia obtenida por cELISA para las 235 muestras fue menor que la prevalencia obtenida por mn-PCR, siendo la seroprevalencia total del 62,6% (147/235). El 61,7% (145/235) de los animales mostraron anticuerpos frente a *T. equi*, el 3,8% (9/235) frente a *B. caballi* y el 2,98% (7/235) frente a ambos parásitos (parasitación mixta). Se realizó una comparación entre la cELISA y la mn-PCR calculando el índice  $\kappa$  de Cohen, mostrándose una concordancia entre ambas técnicas muy superior para *T. equi* ( $\kappa=0,83$ ) que para *B. caballi* ( $\kappa=0,06$ ).

Además, se realizó un análisis filogenético del gen *RAP-1* de *B. caballi*, el cual mostró que las cepas españolas estaban agrupadas con las de procedencia israelí.

## **4.- Materiales y métodos**

---



## 4.1.- Estudio I

### «Genetic variation of the $\beta$ -tubulin gene of *Babesia caballi* strains»

La información genética de los parásitos que causan la PE resulta muy relevante, puesto que ayuda tanto a su clasificación taxonómica como a la posibilidad de mejorar el diagnóstico mediante técnicas de biología molecular. En este estudio se pretendió, por un lado, contribuir al conocimiento de uno de los genes más desconocidos de *B. caballi*, el gen de la  $\beta$ -tubulina y, por otro lado, desarrollar marcadores genéticos que permitieran no sólo la detección de este parásito, sino también el conocimiento de su epidemiología.

En esta investigación, se emplearon muestras de sangres (n=5) procedentes de caballos de la provincia de Cáceres, con los síntomas propios de la PE y que fueron diagnosticados como positivos a *B. caballi* por la observación microscópica de frotis sanguíneos teñidos con panóptico rápido. Además, se obtuvieron unas muestras de sangres de caballos crónicos a PE (n= 20) negativos por microscopía, pero positivos por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), siguiendo la metodología descrita por Camacho *et al.* (2005). Estas muestras igualmente resultaron positivas por la técnica inmunoenzimática (cELISA), testadas con un kit comercial (VMRD<sup>®</sup>, Inc, Pullman, WA, USA). La procedencia de dichas muestras era diversa, pues fueron remitidas desde diferentes puntos de la geografía española, en concreto de Badajoz (n=6), Cáceres (n=2), Cádiz (n=7) y Segovia (n=5). Por último, se empleó el ADN obtenido de una sangre procedente de Málaga, previamente cultivada y posteriormente criopreservada, para la secuenciación del gen de la  $\beta$ -tubulina del parásito estudiado.

La extracción de ADN se hizo siguiendo el protocolo propuesto por Fernández-García (2012). Se diseñaron unos cebadores universales (B-Tub F y B-Tub R), para ello se empleó en primer lugar el programa MEGA4, que permitió la alineación de las secuencias de distintas especies de Babesias y Theilerias disponibles en la base de datos GenBank (Tabla 1 del artículo I). En segundo lugar, se usó el programa informático Primer3web, una aplicación online para el diseño de los oligonucleótidos (Untergasser *et al.*, 2013). Estos oligonucleótidos se mostraron eficaces en la amplificación de material genético de *B. caballi*. Tras la amplificación de las diferentes muestras de las que disponíamos, se seleccionó y procedió a la secuenciación de la muestra procedente de Málaga (número de acceso: KX358867). Con esta secuencia y las procedentes del

GenBank, se rediseñaron los cebadores universales. Estos nuevos oligonucleótidos permitían la amplificación tanto de *B. caballi* como de *T. equi* (B-Tub2 F y B-Tub2 R). La distinción entre los fragmentos de ambos parásitos se podía hacer claramente por el tamaño molecular, puesto que el fragmento de *B. caballi* tenía una longitud de 826 pares de bases nucleotídicas (pb) y el de *T. equi* 100 pb menos, es decir, 718 pb. Por último, se diseñó una pareja de cebadores que amplificaba específicamente el material genético de *B. caballi*, basándose en regiones conservadas de las dos secuencias conocidas de este parásito (AJ289246 y KX358867). Este segmento se extendía desde el inicio del primer intrón hasta el segundo exón (parcialmente incluido), y tenía un tamaño de 345 pb. La especificidad de estos oligonucleótidos fue estudiada usando ADN de *T. equi*, el cual no fue amplificado con estos oligonucleótidos.

Además, se diseñó una PCR-RFLP para poder discernir entre las dos únicas secuencias del gen de la  $\beta$ -tubulina conocidas, la de procedencia francesa y la secuencia española. Para esta finalidad se empleó un software de simulación (PROPHET 5.0 software, BBN Systems and technologies) para predecir los enzimas de restricción adecuados para la discriminación de ambas secuencias (*Hae*III y *Hinf*I). El enzima de restricción *Hae*III debería cortar la secuencia de origen francés, pero no la española, mientras que el enzima *Hinf*I, tendría que cortar ambas secuencias (Tabla 3 del estudio I).

## 4.2.- Estudio II

### «Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Spain»

En este trabajo se realizó un estudio seroepidemiológico con el objetivo de conocer la distribución geográfica y la seroprevalencia de la PE en el centro y sur de España.

Para ello, recolectamos 3100 muestras de suero de caballos de distinto sexo, edad, capa, raza y origen geográfico. Los sueros y plasmas, obtenidos a partir de sangre extraída por punción en la vena yugular, se mantuvieron congelados hasta que fueron analizados con una de las técnicas inmunológicas más empleadas para la detección de PE, como es la técnica IFI (Camacho *et al.*, 2005). Las muestras se examinaron con un microscopio de epifluorescencia (Leica DMLS<sup>®</sup>). El antígeno empleado fue obtenido de cepas de procedencia española. Las muestras se recogieron en yegadas de 22 provincias de cinco regiones (Andalucía, Castilla La Mancha, Castilla y León, Madrid y Extremadura) de nuestra geografía. Para determinar el número de muestras que debían recogerse de cada área, se empleó el programa Win Episcopy 2.0 (Thrusfield *et al.*, 2001). De tal manera, que usando los datos del censo equino (MAGRAMA, 2013), se estableció que al menos 381 muestras de animales debían de analizarse de cada región. Una parte de los sueros fueron seleccionados al azar (n=108) y testados usando también la técnica ELISA competitivo o cELISA (VMCR<sup>®</sup>, Inc. Pullman, WA, USA), siguiendo las instrucciones del propio kit comercial. Las placas se leyeron con un lector de placas (Multiskan Ascent, Thermo Electron Corporation<sup>®</sup>).

Los resultados obtenidos en este último grupo de sueros, al usar ambos métodos (IFI vs. cELISA), fueron comparados empleando el índice  $\kappa$  de Cohen. La interpretación de los valores  $\kappa$ , fue como sigue a continuación: valores  $\kappa$  menores de 0, indican que no hay concordancia. Valores entre 0-0,20 determinan que hay un acuerdo insignificante entre las técnicas. Valores de entre 0,21-0,40 indican un acuerdo discreto, si se encuentran entre 0,41-0,6, el acuerdo es moderado, si están entre 0,61-0,80, es sustancial y si es de entre 0-8 y 1, el acuerdo es casi perfecto.

Por último, se realizó un estudio estadístico para determinar los factores de riesgo que pudieran estar implicados en la transmisión de esta enfermedad, usando el

paquete SPSS versión 11.0 bajo licencia de la UNEX. En concreto, se empleó la regresión logística binaria y se calcularon las razones de probabilidades u “odds ratios” (OR) con un intervalo de confianza del 95%. La significación estadística de la seroprevalencia entre dos regiones fue calculada usando el método Monte Carlo.

### 4.3.- Estudio III

#### «A multinested-PCR for detection of the equine piroplasmids *Babesia caballi* and *Theileria equi*»

La PE es una enfermedad transmitida por garrapatas y causada por los hemoprotozoos *B. caballi* y *T. equi*. Esta parasitosis impide el libre tránsito de los équidos de todo el mundo, puesto que los países libres de enfermedad exigen la realización de pruebas diagnósticas que determinen que el caballo no padece esta hemoparasitosis. Por ello, es necesaria una técnica con alta sensibilidad y especificidad aplicable al diagnóstico de esta enfermedad.

El principal objetivo de este estudio fue desarrollar una técnica molecular innovadora y eficaz para el diagnóstico de la PE. El método desarrollado consistió en una PCR múltiple y anidada (mn-PCR), que combinaba, como su propio nombre indica, una PCR múltiple con una PCR anidada. Así pues, consiste en realizar dos PCR consecutivas anidadas y múltiples, en las cuales se emplearon cebadores que amplificaban material genético de ambos parásitos de forma simultánea. Para realizar la mn-PCR se diseñaron 7 pares de cebadores a partir de 4 genes (los genes *18S rRNA*,  $\beta$ -*tubulina*, *EMA-1* y *cytB* para *T. equi*. Los genes *18S rRNA*,  $\beta$ -*tubulina* y *RAP-1* para *B. caballi*).

Para el desarrollo de esta técnica se emplearon 21 muestras de sangre que procedían de caballos en la fase aguda de la enfermedad, y que fueron diagnosticadas como positivas mediante de la observación microscópica de extensiones de sangre teñidas con panóptico rápido (15 de ellas eran positivas a *T. equi*, 5 positivas a *B. caballi* y una positiva a ambos parásitos). Además, se utilizaron tres muestras negativas por parasitoscopia, que lo fueron también mediante la prueba IFI (Camacho *et al.*, 2005) y el kit comercial cELISA (VMCR<sup>®</sup>, Inc. Pullman, WA, USA). Todas las muestras empleadas para el desarrollo de la mn-PCR fueron recogidas en cuatro comunidades autónomas: Andalucía (n=7), Castilla-La Mancha (n=3), Castilla-León (n=5) y Extremadura (n=9).

Además, se extrajeron sangres de 235 caballos de dos regiones distintas de España (Castilla y León, n=205; Extremadura, n=30) para comprobar la efectividad de la mn-PCR en el diagnóstico de caballos asintomáticos. De cada animal se obtuvieron dos tubos de sangre (BD Vacutainer<sup>®</sup>), uno con anticoagulante (EDTA) y otro sin él.

Los sueros fueron congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  y las sangres a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta la extracción de ADN, la cual se realizó empleando la técnica “salting out” modificado (Millar *et al.*, 1988; Fernández-García, 2012). Los sueros recogidos fueron analizados mediante la técnica eELISA siguiendo las indicaciones propuestas en el kit comercial. Las placas se leyeron en un lector de placas (Thermo Scientific Multiskan Ascent Microplate Reader<sup>®</sup>).

Para desarrollar la técnica mn-PCR se diseñaron diferentes parejas de cebadores. Para la amplificación de los fragmentos de ADN en la primera fase de la PCR, se emplearon cinco parejas de oligonucleótidos, los cebadores externos (outer). De estas cinco parejas, tres se diseñaron específicamente para la mn-PCR, una pareja se había empleado en el estudio I de esta tesis y la última pareja fue diseñada por Alhassan *et al.*, (2005). También se emplearon otras siete parejas de oligonucleótidos internos (inner) para amplificar fragmentos de menor tamaño (cuatro amplificaban fragmentos de ADN de *T. equi* y tres para *B. caballi*). De todas estas parejas, seis fueron diseñadas para la mn-PCR y una ya se había publicado en el estudio I de la presente tesis (en la tabla 1 del estudio III se pueden consultar todos los cebadores). Para llevar a cabo el diseño de estos oligonucleótidos se emplearon diferentes secuencias de los distintos genes de ambos parásitos (secuencias que pueden verse en la tabla S1 del estudio III). Todas estas secuencias se alinearon con el programa MEGA6.05 (Tamura *et al.*, 2013). Después, se comprobó el éxito de amplificación de todas las parejas de oligonucleótidos por separado. En la primera PCR se empleó una pareja de cebadores que amplificaron un fragmento conservado del gen *18S rRNA* en ambos parásitos (Alhassan *et al.*, 2005), al igual que ocurría con la pareja de oligonucleótidos que amplificaron el gen de la  $\beta$ -*tubulina* (estos últimos oligonucleótidos fueron publicados en el estudio I). Los otros cebadores eran específicos de especie (*EMA-1*, *cytB* y *RAP-1*). En la segunda PCR todos los oligonucleótidos se diseñaron sobre la base de regiones de los genes específicos de especie. Podemos añadir que los cebadores se diseñaron para que los fragmentos amplificados tuvieran un peso molecular siempre mayor para *B. caballi* que para *T. equi*, de tal forma que, tras la electroforesis en los geles de agarosa, se podía realizar el diagnóstico a simple vista, pues las bandas de *B. caballi* tenían un tamaño superior a 300 pb mientras que las de *T. equi* eran inferiores a este tamaño. En la mezcla (master mix) empleada para realizar la primera PCR se añadieron los cebadores para la amplificación de todos los genes, tanto de *B. caballi* como de *T. equi*. En la segunda PCR, se emplearon dos mezclas (master mix), cada una incluía los cebadores de cada

parásito por separado. Los productos PCR de cada muestra problema se incluyeron en el mismo pocillo del gel para agilizar el diagnóstico.

Adicionalmente, y debido a las discrepancias que surgieron en los resultados mostrados por las técnicas eELISA y mn-PCR en el diagnóstico de *B. caballi*, se hizo una secuenciación del gen *RAP-1* de tres muestras de diferentes localizaciones geográficas (Cáceres, Málaga y Segovia). Las secuencias fueron obtenidas empleando un analizador genético capilar ABI 3130<sup>®</sup> (Applied Biosystems). Con las secuencias obtenidas (números de acceso MH538120, MH538121 y MH538122), junto a 34 secuencias más, procedentes de la base de datos GenBank (tabla S2 del estudio III), se realizó una reconstrucción filogenética usando un algoritmo median-joining, con el software NETWORK 4.1.1.1. (Fluxus Technology Ltd.)

El estudio estadístico se realizó con el programa SPSS versión 15.00 bajo licencia de la UNEX. Se compararon estadísticamente los resultados obtenidos por cada una de las pruebas diagnósticas (mediante el índice  $\kappa$  de Cohen) y se analizaron la edad y el sexo como posibles factores de riesgo asociados a esta enfermedad mediante el Test exacto de Fisher y el test McNemar. Los OR se calcularon usando una regresión logística binaria con el programa IBM SPSS Statistics 15.0 para Windows (IBM Corporations).



## **5.- Resultados**

---



## 5.1.- Aportaciones al conocimiento genético de *Babesia caballi*

### Estudio I

En el estudio I, se secuenció un fragmento del gen de la  $\beta$ -tubulina de *B. caballi* (número de acceso KX358867) de una muestra procedente de España (Málaga). La secuencia aportada tenía una longitud de 761 pb. Para dicha secuenciación se había diseñado una pareja de oligonucleótidos (B-Tub) basándonos en los datos de diferentes secuencias de distintas especies de Babesias y Theilerias (Tabla 1 del estudio I), pues hasta ese momento no había nada más que una secuencia de origen francés disponible del gen de la  $\beta$ -tubulina de *B. caballi* en la base de datos GenBank (número de acceso AJ289246). Una vez se obtuvo la secuencia española, se rediseñaron los cebadores. Estos nuevos oligonucleótidos permitieron la amplificación simultánea de este fragmento de gen tanto de *B. caballi* como de *T. equi* (B-Tub2), pudiendo distinguirse ambos parásitos por el tamaño del fragmento amplificado (718 pb en el caso de *T. equi* y 826 pb para *B. caballi*, es decir, una diferencia de 100 pb). Por último, se diseñó una nueva pareja de oligonucleótidos para amplificar, exclusivamente, un fragmento de *B. caballi* (GM B-Tub). Todos los primers se pueden consultar en la tabla 2 (del estudio I).

Gracias a la nueva secuencia, se confirmaba por primera vez la existencia de variación genética en el gen de la  $\beta$ -tubulina en *B. caballi*.

Sólo se pudo utilizar un fragmento de 460 pb para la comparación de ambas secuencias, debido a que la secuencia de origen francés no tenía mayor longitud. Dicho fragmento se extendía desde el exón I (nucleótidos del 1 al 63), todo el intrón I (nucleótidos del 64 al 233) y el exón II (nucleótidos del 234 al 460) de dicho gen. Tras la comparación realizada usando el programa BLASTN 2.2.20 (Altschul *et al.*, 1997), programa disponible en la página web del NCBI, se encontraron 86 sitios polimórficos, un 81% de similitud y un 3% de ins/del (puntos con inserciones y deleciones). El análisis realizado mediante el programa DnaSP versión 4.0 (Rozas *et al.*, 2003) mostró unos resultados interesantes, pues de los 76 tripletes que posee el exón II, en 19 de ellos se encontraron mutaciones silenciosas, esto es, que no provocan cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína  $\beta$ -tubulina. Gracias al análisis comparativo entre las dos secuencias, se constató que, pese a la existencia de ese número de polimorfismos, no cambiaba la estructura primaria de la proteína. Esto es la norma en

genes muy conservados, como es el de la  $\beta$ -*tubulina*. Además, el primer intrón mostró una variación de tamaño debido a la existencia de una delección de 2 pares de bases. Todos estos datos hacen pensar que el gen de la  $\beta$ -*tubulina* pueda mostrar variaciones entre y dentro de las especies de *Babesia*.

En este estudio se validaron los resultados previos mediante la amplificación de cinco muestras de caballos que presentaban una infección en fase aguda y de 20 muestras de caballos en fase crónica empleando los oligonucleótidos específicos para *B. caballi*. Todas las muestras resultaron ser positivas tras la realización de la PCR.

Por último, los fragmentos amplificados fueron digeridos con enzimas de restricción (*Hae* III and *Hinf* I) para determinar si alguna de las dos cepas conocidas era la que parasitaba los animales analizados. Basándonos en el trabajo de predicción de cortes de las secuencias disponibles, la enzima *Hinf* I cortó los fragmentos, pero *Hae* III no lo hizo. Este resultado confirmó que la cepa presente en los caballos testados era la de origen español (predicción del tamaño de los productos cortados por los enzimas de restricción en la tabla 3, estudio I).

### Estudio III

En el estudio III de esta tesis, se recoge otra de las aportaciones al conocimiento genético de *B. caballi*, en concreto del gen *RAP-1*. Debido a la baja concordancia entre las técnicas IFI y cELISA ( $\kappa=0,22$ ) constatado en el estudio II y a los pobres resultados que mostraba el diagnóstico realizado mediante la técnica cELISA en el estudio III, se decidió secuenciar un fragmento del gen *RAP-1* de tres muestras de diferente procedencia española (Cáceres, Málaga y Segovia). Esta investigación se consideró necesaria, pues dicho gen es el que se emplea para la obtención de las proteínas recombinantes y los anticuerpos monoclonales empleados en el kit comercial cELISA. Con esta información se efectuó un estudio genético, empleando no sólo estas tres secuencias de 769 pb (números de acceso MH538120 al MH 538122), sino todas las disponibles en el GenBank (Tabla S2 del material adicional, estudio III). Tras realizar el análisis con el programa BLASTN 2.2.20 (Altschul *et al.*, 1997), todas las secuencias españolas mostraban un 100% de homología con tres secuencias procedentes de Israel (KF059875, KF059877 y KF059879). Tras adaptar las secuencias a una longitud de 358 pb (desde el nucleótido 290 hasta el 647, correspondientes a la secuencia completa del *RAP-1*, con número de acceso AF092736), se encontró una fuerte señal filogenética que permitió el establecimiento de clados usando el programa Network 4.1.1.1 (Fluxus

Technology Ltd.). En el cladograma resultante se pudo constatar la existencia de dos superclados a escala global (Figura 4, estudio III). El superclado A, agrupaba secuencias procedentes de África y del Mediterráneo, que se separaban en dos linajes: el A1 con secuencias de la cuenca mediterránea y el A2 con aquellas originarias de África. El superclado B incluía un gran número de secuencias del norte de Asia y de Sudamérica. Este clado también se dividía a su vez en tres linajes (B1, B2 y B3). El linaje B1 mostraba una configuración parecida a la forma de una estrella, con secuencias del norte de Asia (Mongolia) y Norteamérica, así como con una rama de procedencia egipcia. El linaje B2 se localizaba geográficamente en áreas tropicales de Asia y Sudamérica. El tercer linaje (B3) estaba constituido por una secuencia aislada con origen en Mongolia. Así pues, se constató una importante separación a nivel genético entre las cepas de origen español y las de origen americano.

## 5.2.- Estudio epidemiológico de la Piroplasmosis Equina en España

### Estudio II

En el estudio II de esta tesis, se analizaron 3100 sueros procedentes de diferentes provincias españolas mediante IFI y se obtuvieron los siguientes resultados: la seroprevalencia total alcanzada fue del 52,45% (ES  $\pm$  0,009). De todas las muestras, 1381 resultaron ser positivas a *T. equi*, es decir, el 44,55% (ES  $\pm$  0,009); mientras que 643 sueros fueron positivos a *B. caballi*, por lo tanto, el 20,74% (ES  $\pm$  0,007). En 398 casos (12,84%) se detectó una parasitación mixta (ES  $\pm$  0,006).

Tras realizar el estudio estadístico empleando un modelo de regresión lineal para variables binarias, comprobamos que la edad ( $p < 0,0001$ ), la raza ( $p < 0,004$ ) y la localización geográfica ( $p < 0,0001$ ) eran variables significativamente asociadas a la presencia de PE, mientras que el color de la capa y el sexo no lo eran.

De todas las comunidades autónomas muestreadas (Andalucía, Castilla y León, Castilla la Mancha, Madrid y Extremadura), la mayor seroprevalencia de PE se detectó en Castilla la Mancha (67,54%;  $p < 0,001$ ) y la menor en Madrid (38,14%;  $p < 0,001$ ). En ambos casos el resultado fue estadísticamente significativo, a diferencia de lo que

sucedió con el resto de las comunidades autónomas (Andalucía con una seroprevalencia del 50,95%, Castilla y León del 53,62% y Extremadura del 51,5%), según los resultados calculados empleando el método Monte Carlo. Si analizamos los resultados con respecto a cada parásito en particular, y debido a que los OR eran significativos, la localización geográfica resultó ser un factor de riesgo para la presencia de *T. equi* en Extremadura y Castilla y León. Además, Extremadura presentaba una seroprevalencia de *B. caballi* significativamente inferior que la mostrada en otras regiones.

La edad media de los animales parasitados osciló entre los seis años (en Andalucía y Extremadura) y los diez (en Castilla y León). Si nos centramos en los resultados para *T. equi*, se ha comprobado que la diferencia en las medias de edad entre los animales positivos y negativos era de 1,27 (8,19 [95% IC:7,86-8,53] - 6,92 [95% IC:6,61-7,22]). Comprobamos que los intervalos de confianza no se solapaban, apoyándose así, el hecho de que la edad es un factor de riesgo para la presencia de PE. Además, podemos añadir que los OR se incrementaban entre los 2 y los 11 años de edad de los animales, acompañado del hecho de que hay un cambio en la significación estadística de los porcentajes de seroprevalencia a partir de los once años de edad, variando (pero no superando) la seropositividad entre 44% y 65% a partir de esa edad (datos en la tabla S3 del material adicional, estudio II). En el caso de *B. caballi*, la diferencia entre las medias de edad de los animales positivos y negativos era ligeramente superior a la de *T. equi*, pues resultó ser de 1,75 (8,89 [95% IC:8,31-9,57]-7,14 [95% IC:6,90-7,39]). El riesgo de infección aumentaba hasta los 12 años de edad, apareciendo valores entre el 20-45% de seropositividad. A partir de esta edad, no se encontraron diferencias significativas de seroprevalencia.

Al referirnos a la raza de los animales, los valores OR nos indicaban que había una diferencia significativa entre las razas autóctonas (PRE y los caballos de raza Lusitana) y otras razas como los caballos PRA, los de raza PSI y los cruzados, entre otros. Así, los caballos de razas autóctonas presentaban una prevalencia menor que las otras razas. Mientras que parece que había una asociación significativa entre los caballos PRA y PSI y la presencia de *B. caballi*.

Si nos centramos en la parasitación según el sexo del animal, podemos decir que, en general, los resultados no son muy diferentes entre los machos y hembras en ambas

Castillas, aunque sí varían en el resto de comunidades. Así, en el caso de *T. equi* en Extremadura, hay más hembras parasitadas que machos (diferencia de nueve puntos porcentuales). En Andalucía y Madrid el número de hembras con anticuerpos frente a *B. caballi* es mayor que en los machos (nueve y ocho puntos porcentuales de diferencia entre ambos sexos, respectivamente). Refiriéndonos a este mismo hemoparásito, en Extremadura predominan los machos que presentan anticuerpos (diferencia de siete puntos porcentuales con respecto a las hembras).

En este estudio se demostró que *T. equi* era más seroprevalente que *B. caballi*, pero ambos parásitos estaban presentes en todas las provincias analizadas. Sin embargo, los resultados muestran que a medida que nos desplazamos hacia el norte, las seroprevalencias para ambos parásitos se van igualando.

### Estudio III

En el estudio III se analizaron 235 muestras de caballos asintomáticos no sólo con la técnica mn-PCR, sino también con los kits comerciales de cELISA. En este estudio, la seroprevalencia total fue del 62,6% (n=147). En el caso de *T. equi*, el 61,7% de los caballos mostraron seropositividad (n=145), mientras que sólo el 3,8% de los sueros (n=9) poseían anticuerpos frente a *B. caballi*. De todos ellos, siete caballos resultaron ser positivos a ambos antígenos, es decir, padecían una parasitación mixta (3,0%).

La prevalencia total detectada por mn-PCR fue del 72,8%. La prevalencia para *T. equi* fue del 66% y para *B. caballi* del 29,4%. Las infecciones por ambos parásitos se diagnosticaron en el 22,6% de los casos.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos por cada una de las técnicas, constató que los positivos obtenidos para *B. caballi*, tanto por cELISA como por mn-PCR, no se asociaron significativamente a las variables edad y sexo. En cambio, los factores de riesgo asociados con la presencia de *T. equi* por cELISA fueron la edad ( $p=0,001$ ) y el sexo ( $p=0,039$ ), pero sólo la edad ( $p=0,001$ ) en el caso de la mn-PCR (Tabla 2a). Aunque el análisis realizado mediante regresión logística confirmó que sólo la edad de los animales era un factor significativo. Los caballos más viejos eran los que tenían más posibilidades de ser positivos a *T. equi* por mn-PCR y cELISA, pero no fue posible confirmar estos mismos resultados para los datos obtenidos para *B. caballi* (Tabla 2b, estudio III).

### 5.3.- Desarrollo de la técnica PCR múltiple y anidada para el diagnóstico de la Piroplasmosis Equina

#### Estudio III

Las condiciones de la mn-PCR se probaron y ajustaron, usando ADN de un total de 24 muestras de sangres (controles tanto negativos como positivos), hasta que la prueba funcionó correctamente. Los caballos se consideraron positivos cuando al menos uno de los siete marcadores genéticos fue amplificado (*18S rRNA*, *β-tubulina*, *EMA-1* y *cytB* para *T. equi* y *18S rRNA*, *β-tubulina* y *RAP-1* para *B. caballi*). La mn-PCR se diseñó a modo de código de barras, para que así, el peso molecular de los fragmentos amplificados de los genes específicos de *B. caballi* fuera superior a 300 pb y los específicos de *T. equi* por debajo de ese tamaño. Un caballo se diagnosticaba como portador de *B. caballi* cuando se observaba al menos una de las bandas de ADN por encima del límite de 300 pb, mientras que, en los casos de bandas con un peso molecular inferior a esos 300 pb, se consideraba infectado por *T. equi*. Una infección mixta era confirmada si al menos se amplificaba un gen específico de cada uno de los parásitos.

Como hemos indicado anteriormente, el análisis de ADN realizado a las 235 muestras de caballos asintomáticos incluidas en el estudio, mostró que el 72,8% de los animales (n=171) fueron positivos a PE. La prevalencia de *T. equi* resultó ser del 66% (n=155) mientras que para *B. caballi* fue del 29,4% (n=69). Las infecciones mixtas se detectaron en el 22,6% de los casos (n=53).

Con respecto al éxito de amplificación de los oligonucleótidos diseñados, podemos indicar que en general, es alto. Así, los cebadores para la amplificación de ADN de *T. equi* mostraron los siguientes resultados en las muestras diagnosticadas como positivas para dicho parásito (155/235): el gen de la *β-tubulina* se amplificó en 142 de las muestras (91,6%), el *cytB* en 140 casos (90,3%) y el *18S rRNA* en 137 animales (88,4%). En contraste, el gen *EMA-1* fue efectivo en el diagnóstico de 96 caballos, es decir, el 61,3% de las muestras positivas a *T. equi*. Además, es interesante añadir que dicho gen aparecía en combinación con uno o varios de los genes restantes en 95 de los casos. Del total de 155 muestras diagnosticadas como positivas a *T. equi*, en 95 (61,2%) se amplificaron simultáneamente los 4 marcadores genéticos, en 30

muestras (19,4%) aparecieron tres de estos marcadores, en 15 de los casos (9,7%) dos genes y otros 15 caballos (9,7%) se diagnosticaron como positivos apareciendo una sola de las bandas de ADN.

El análisis de las 69 muestras (69/235) confirmadas como positivas a *B. caballi* mostró los siguientes resultados: los fragmentos del gen *RAP-1*, *18S rRNA* y  *$\beta$ -tubulina* fueron amplificados en 52 (75,4%), 46 (66,7%) y 41 (59,4%) de las muestras de ADN, respectivamente. En 26 de las muestras se amplificó ADN de los tres marcadores genéticos, en 18 de ellas, se observaron las bandas correspondientes a dos marcadores y en las restantes 25 muestras se diagnosticó como positivo al animal con la presencia de uno de los marcadores genéticos.

Al realizar la electroforesis de las muestras sobre el gel de agarosa, pudimos comprobar que aparecía una banda inespecífica de un peso molecular de unos 250 pb. Para confirmar que esta banda era un fragmento inespecífico, los oligonucleótidos F-inner (18Sequi y EMA-1) y R-inner (GM-tub y cytB) para *T. equi*, se marcaron con una molécula fluorescente (estos cebadores se pueden ver en la tabla 1 del artículo III) y los fragmentos amplificados mediante la mn-PCR, empleando los cebadores marcados, se detectaron en un analizador genético capilar ABI 3130 (Applied Biosystems). Las muestras empleadas para realizar esta comprobación fueron los controles positivos y el ADN de ocho muestras de animales enfermos (en fase aguda). Como hemos dicho, los productos obtenidos se visualizaron por electroforesis capilar (Figura 3, estudio III) para determinar el tamaño molecular exacto de todos los fragmentos amplificados, confirmando así, que ninguno de ellos se correspondía con la banda inespecífica.

## 5.4.- Comparación entre técnicas serológicas y moleculares de diagnóstico en Piroplasmosis Equina

### Estudio II

En este estudio se realizó una comparación de la técnica IFI con la cELISA empleando 108 muestras. De todos los sueros analizados, 91 mostraban los mismos resultados por ambas técnicas (84,26%) en la detección de *T. equi*. Mientras que para *B. caballi*, surgieron discrepancias en 19 de las muestras, obteniendo los mismos resultados en el 82,41% de los casos (89 sueros). Al analizar más en detalle estos datos, observamos que siete sueros positivos a IFI fueron negativos empleando la cELISA y 10 sueros fueron negativos por IFI y positivos mediante cELISA. En el caso de *B. caballi*, 16 caballos resultaron ser positivos mediante IFI, pero no mostraron reactividad en la prueba cELISA y tres caballos fueron negativos por IFI, pero positivos por cELISA.

La concordancia entre ambas técnicas serológicas empleando el coeficiente  $\kappa$  de Cohen resultó ser  $\kappa=0,68$  (68%) para *T. equi* (grado de acuerdo sustancial), valor bastante superior al obtenido para *B. caballi*, que fue  $\kappa=0,22$  (22%), es decir, un grado de acuerdo discreto.

### Estudio III

No sólo realizamos una comparación entre la técnica IFI y la cELISA (n=3100), sino que, además, comparamos los resultados obtenidos por cELISA y mn-PCR (n=235). El análisis estadístico confirmó que la técnica mn-PCR detectaba una prevalencia de PE en caballos asintomáticos significativamente mayor si la comparábamos con la cELISA ( $\chi^2=18,581$ ,  $df=1$ ,  $p<0,001$ ). Cuando se realizaron comparaciones entre la mn-PCR y la cELISA, usando la información de prevalencia de cada parásito por separado, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos para la prevalencia total de PE ( $p=0,031$  y  $p=0,0001$  para *B. caballi* y *T. equi*, respectivamente), demostrándose en ambos casos, que la mn-PCR detectaría los caballos portadores asintomáticos de una manera más eficaz. Además, se hizo una comparación entre ambas técnicas empleando el índice  $\kappa$  de Cohen tanto para *B. caballi* como para *T. equi*, encontrándose una alta concordancia para *T. equi* ( $\kappa=0,83$  ES  $\pm 0,037$ ;  $p=0,0001$ ), siendo insignificante para *B. caballi* ( $\kappa=0,06$  ES  $\pm 0,040$ ;  $p=0,13$ ).

## **6.- Discusión**

---

---



La PE es una enfermedad distribuida por gran cantidad de países de todo el mundo (Uilenberg, 2006), presentándose como una parasitosis endémica difícil de controlar. Por ello, trabajos como los realizados en esta tesis, revelan la importancia tanto de los estudios epidemiológicos (conocimiento de la distribución y prevalencia), como de la mejora de las técnicas diagnósticas (sobre todo aquellas basadas en la amplificación de ADN), pues ayudan a disminuir su incidencia y, con ello, contribuir a su control. Para llegar a mejorar los métodos de diagnóstico, fundamentalmente moleculares, sería necesario aumentar el conocimiento relativo a la información genética aplicada al diagnóstico de esta hemoparasitosis. Teniendo en cuenta todas estas premisas, se desarrollaron los diferentes trabajos que conforman esta tesis doctoral.

## **6.1.- Aportaciones al conocimiento genético de *Babesia caballi***

### Estudio I

Algunos genes de *B. caballi* y *T. equi* han sido estudiados con un doble propósito, el desarrollo de técnicas diagnósticas y el análisis de filogenias. Genes como el *18S rRNA* (común para ambos parásitos) o incluso el *EMA-1* (exclusivo de *T. equi*) se han usado con estos fines.

Así, para el gen *18S rRNA* cabe citar los trabajos de Criado-Fornelio *et al.* (2004), Nagore *et al.* (2004), Bhoora *et al.* (2009), Bhoora *et al.* (2010b), Salim *et al.* (2010), Adaszek *et al.* (2011), Hall *et al.* (2013), Munkhjargal *et al.* (2013), Qablan *et al.* (2013), Seo *et al.* (2013), Kizilarслан *et al.* (2015), Liu *et al.* (2016), Guven *et al.* (2017) y Díaz-Sánchez *et al.* (2018). Y respecto al gen *EMA-1* son Bhoora *et al.* (2010c), Kumar *et al.* (2013) y Munkhjargal *et al.* (2013), quienes realizaron las correspondientes aportaciones a la identificación de grupos genéticos mediante el establecimiento de las pertinentes relaciones filogenéticas de *T. equi*.

Sin embargo, otros genes son mucho menos conocidos, como es el caso del gen de la  *$\beta$ -tubulina*. En general, podemos decir que apenas existe información sobre este gen en las Babesias y, en particular, de *B. caballi* (Cacciò *et al.*, 2000). En el estudio I de esta tesis describimos la secuencia de un fragmento de dicho gen obtenido de una cepa de procedencia española (Málaga), lo cual ha contribuido a conocer la profundidad

de la variación genética dentro de esta especie de piroplásmidos. Es una contribución relevante, ya que por primera vez se ha obtenido información molecular del gen de la  $\beta$ -*tubulina* de una cepa procedente de infecciones en España (número de acceso KX358867). En nuestro estudio demostramos que existen diferencias, aunque con un grado de similitud molecular del 92%, entre las dos únicas secuencias conocidas del gen de la  $\beta$ -*tubulina* de *B. caballi*. Esta aportación es notable, pues al igual que veremos con el gen *RAP-1*, ayudará a realizar en el futuro un análisis profundo de la clasificación filogenética de esta especie de parásito, así como una mejora en el diagnóstico de este protozoo. En relación a esto último, se consiguió diseñar unos oligonucleótidos específicos para la amplificación de un fragmento de este gen ( $\beta$ -*tubulina*) mediante PCR (y que posteriormente se incluyó en la mn-PCR), así como el desarrollo de una PCR-RFLP que permitió el diagnóstico diferencial entre cepas de *B. caballi*. Cacciò *et al.* (2000) también emplearon esta técnica (PCR-RFLP) en la discriminación de parásitos, en concreto para la distinción de diferentes especies de *Theileria* y *Babesia*, pero en ningún caso para diferenciar cepas de una misma especie, como mostramos en nuestro estudio.

### Estudio III

La aportación al conocimiento genético de *B. caballi* realizado en esta tesis doctoral no acaba aquí, ya que también se secuenció un fragmento del gen *RAP-1* en el estudio III. Destacamos que, aunque también se han construido algunas filogenias basadas en dicho gen, son menos abundantes que las realizadas con otros genes como el *18S rRNA* (Bhoora *et al.*, 2010b; Munkhjargal *et al.*, 2013; Rapoport *et al.*, 2014). Como consecuencia de la baja concordancia que encontramos entre la mn-PCR y la cELISA para *B. caballi*, sumado al aún amplio desconocimiento genético que existe sobre las cepas de procedencia española de esta especie, sólo se conocen secuencias del gen *18S rRNA* aportadas por Criado-Fornelio *et al.* (2004) y Nagore *et al.* (2004), decidimos aportar información respecto al gen *RAP-1* de muestras de nuestro país. Se eligió precisamente este gen porque el kit comercial cELISA para la detección de *B. caballi* emplea tanto la proteína recombinante como los anticuerpos monoclonales que se producen a partir de la expresión del *RAP-1* (OIE, 2014). En el artículo III se utilizaron tres muestras de diferentes lugares de la geografía española (Segovia, en la comunidad autónoma de Castilla y León, Cáceres en Extremadura y Málaga en Andalucía), procedentes de caballos en una fase clínica aguda y con elevada

parasitemia. A partir de estas tres muestras, se obtuvieron secuencias con una identidad molecular del 100% del gen *RAP-I*, que una vez procesadas en el programa SEQUIN ver.1 (descargado de la página web del NCBI), fueron enviadas a la base de datos GenBank y, posteriormente, tras su revisión por la autoridad competente del GenBank, asignados los correspondientes números de acceso. Estas secuencias recibieron los siguientes números de acceso: MH538120, MH538121 y MH538122, estando disponibles actualmente mediante consulta pública para otros investigadores (anexo II de esta tesis). De nuevo, gracias a nuestras investigaciones se secuenció por primera vez un fragmento de un gen procedente de cepas españolas de *B. caballi*, pero en este caso del *RAP-I*. Como se ha publicado en el estudio III, se comprobó que era idéntica a tres secuencias procedentes de Israel. Tras realizar una reconstrucción filogenética usando metodología network o tridimensional (con secuencias del gen *RAP-I* disponibles en el GenBank junto con las españolas), se comprobó que las secuencias se subdividían en dos superclados (A y B) claramente diferenciados, pero que a su vez contenían diferentes clados con distintas secuencias (figura 4, estudio III). En el superclado A se agruparon las secuencias procedentes de África y del arco mediterráneo, englobando las de España e Israel. El segundo, el superclado B, contenía secuencias procedentes de Asia y América. En 2010, en el árbol filogenético elaborado por Bhoora *et al.* (2010b) se separaban las cepas originarias de Sudáfrica y las americanas, formando dos ramas distintas, al igual que indicamos nosotros. Más tarde, Munkhjargal *et al.* (2013) también sitúan las cepas de Mongolia (asiáticas) en una rama distinta a las sudafricanas, pero junto a las americanas. Rapoport *et al.* (2014) publicaron un árbol filogenético que mostraba información muy similar a la que hemos aportado, pues indicaron que hay dos clados, en uno de ellos (B) se situaban las cepas de América, en el otro (A) las sudafricanas e israelitas. En nuestro cladograma, es destacable que se confirme que las secuencias españolas resultaran diferentes de las secuencias que pertenecen al superclado que incluye las cepas americanas y caribeñas. Este hecho es muy relevante, ya que permite preguntarse si las proteínas que se emplean en el kit comercial inmunoenzimático cELISA, fabricadas a partir del gen *RAP-I* procedente de las cepas (americanas/caribeñas), son genéticamente tan diferentes de las encontradas en España que se pueda poner en entredicho su utilidad en relación al diagnóstico de *B. caballi*. Los estudios de Bhoora *et al.* (2010b), Munkhjargal *et al.* (2013) y Rapoport *et al.* (2014) apoyan esta teoría pues, como nosotros, encuentran diferencias genéticas relevantes entre cepas de distintos países, justificando con ello la ineficacia del kit para

el diagnóstico de *B. caballi*. Así, y de acuerdo con Bhoora *et al.* (2010b), se ha sugerido rediseñar este kit empleando un fragmento más conservado del gen *RAP-1* de las cepas conocidas, con la intención de evitar los problemas de diagnóstico que están apareciendo en ciertos países. Por ello, toda la información molecular, la ubicación geográfica de las cepas y sus diferencias en base a su secuencia, son de gran valor.

Hay que destacar, que el conocimiento genético de *B. caballi* (así como de *T. equi*) se está ampliando continuamente. Seguro que estas investigaciones van a permitir clarificar la clasificación taxonómica de estos protozoos y también ayudarán a mejorar las técnicas diagnósticas existentes, bien rediseñándolas o desarrollando alguna nueva.

## **6.2.- Estudio epidemiológico de la Piroplasmosis Equina en España**

### Estudio II

Los resultados del estudio seroepidemiológico realizado en esta tesis doctoral (mediante la técnica IFI), nos han permitido confirmar que la PE no sólo es endémica en nuestro país, sino que su prevalencia en conjunto es bastante elevada (52,45%). Aunque no se han podido muestrear todas las comunidades autónomas, sí se han chequeado muchas de las provincias de España, pudiendo de este modo, mostrarse un mapa epidemiológico que podría acercarse bastante a la realidad de la PE en el conjunto de España.

Son diferentes los estudios que han demostrado la presencia de la infección por *B. caballi* y *T. equi* desde hace años en el territorio español. Habela *et al.* (1989), Habela *et al.* (1995), Habela *et al.* (2005a) y Camacho *et al.* (2005) emplearon la técnica IFI para ello, y obtuvieron resultados que se asemejan a los presentados en este estudio. En cambio, los resultados expuestos por otros autores discrepan algo más con los obtenidos en nuestro trabajo (García-Bocanegra *et al.*, 2013; Camino *et al.*, 2016, 2018). Estos investigadores usaron, preferentemente, la metodología cELISA. Así, se puede observar que los resultados indicados en las investigaciones anteriores, fueron similares cuando se empleó la misma técnica diagnóstica y diferían cuando se usaron

métodos distintos, pudiendo ser esta la razón que explicaría estas discrepancias, como indican ciertos autores (Kouam *et al.*, 2010; García-Bocanegra *et al.*, 2013; Guidi *et al.*, 2015), Fundamentalmente, las mayores diferencias se obtuvieron con respecto a la seroprevalencia de *B. caballi*, con resultados muy inferiores cuando se empleó la técnica cELISA. Quizás esto se deba a que en el test IFI se han empleado antígenos de cepas autóctonas y, así, los caballos positivos son detectados con mayor fiabilidad que con otras técnicas que no emplean dichas cepas autóctonas (como el kit comercial cELISA), tal y como indicaron Kuttler *et al.* (1988) y Prochno *et al.* (2014).

Al analizar los resultados obtenidos en nuestro trabajo, en relación a la prevalencia de cada uno de los protozoos hemáticos que estamos estudiando, pudimos comprobar que la presencia de *T. equi* (44,55%) fue muy superior (más del doble) a la de *B. caballi* (20,74%). El hecho de que la prevalencia de *T. equi* fuera superior siempre a la de *B. caballi*, es algo en lo que sí coincidieron los resultados de las investigaciones llevadas a cabo en España (Habela *et al.*, 1989; Habela *et al.*, 1995; Habela *et al.*, 2005a; Camacho *et al.*, 2005; García-Bocanegra *et al.*, 2013; Camino *et al.*, 2016, 2018). Algunas razones que podrían explicar esta circunstancia son las siguientes: la presencia de diferentes especies de garrapatas (habilitadas o no para la transmisión de cada parásito), la inexistencia de tratamientos esterilizantes respecto a *T. equi*, por lo cual se mostraría más prevalente (Brüning, 1996; de Waal y Van Heerden, 1994) y porque *B. caballi* puede ser totalmente eliminada bien tras tratamientos con babesicidas o bien porque tiende a desaparecer del torrente sanguíneo tras un tiempo determinado, que oscila entre 1 y 4 años (de Waal y Van Heerden, 1994; Salim *et al.*, 2008; Bartolomé del Pino *et al.*, 2016).

Hay que destacar que *T. equi* resultó ser más prevalente en las áreas del centro y sur peninsular, mientras que *B. caballi* predominaba en la zona norte (León, Palencia y Burgos), como así se desveló en nuestro estudio II (Montes *et al.*, 2017, Figura 1) y como ya comprobaron Habela *et al.* (2000). Quizás este hecho se deba a la desigual distribución de las especies de ixódidos que pueden transmitir estos hemoparásitos, tal y como fue indicado en el estudio llevado a cabo por Habela *et al.* (2005b).

Si hacemos una revisión de los resultados obtenidos por análisis serológico en diferentes estudios llevados a cabo en **Europa**, nos encontramos variaciones según el país y el método diagnóstico empleado. Incluso se detectan diferentes resultados de

seroprevalencia en los estudios epidemiológicos dentro de cada país como sucede en Italia (Moretti *et al.*, 2010; Grandi *et al.*, 2011; Sgorbini *et al.*, 2015; Bartolomé del Pino *et al.*, 2016; Zanet *et al.*, 2017). Pero hay que destacar que en ningún estudio seroepidemiológico realizado en nuestro continente se han encontrado resultados superiores a los descritos en España. En Francia son muy similares (Guidi *et al.*, 2015) y en otros países inferiores como en Grecia (Kouam *et al.*, 2010), Italia (Moretti *et al.*, 2010; Grandi *et al.*, 2011; Sgorbini *et al.*, 2015; Bartolomé del Pino *et al.*, 2016; Zanet *et al.*, 2017), Portugal (Ribiero *et al.*, 2013), Holanda (Butler *et al.*, 2012) y Suiza (Sigg *et al.*, 2010).

Si nos centramos en países pertenecientes a otros continentes, también se pueden observar grandes discrepancias en la seropositividad de esta hemoparasitosis con respecto a la que hemos obtenido en este estudio. Así, en algunos países de **África**, se detectaron seroprevalencias totales inferiores a la nuestra como, por ejemplo, Egipto (Mahmoud *et al.*, 2016) y en otros, sin embargo, son superiores como es el caso de Sudáfrica (Motloand *et al.*, 2008) y Sudan (Salim *et al.*, 2008).

En los estudios realizados en países del **continente americano**, se obtuvieron seroprevalencias superiores a las mostradas en nuestro estudio como, por ejemplo, en Brasil (Xuan *et al.*, 2001c; Asgarali *et al.*, 2007; Heim *et al.*, 2007; Kerber *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2013; Lobanov *et al.*, 2018), Colombia (Tenter *et al.*, 1988), Costa Rica (Posada-Guzmán *et al.*, 2015) y Venezuela (Mujica *et al.*, 2011). Pero en otros estudios se detectaron cifras inferiores, como en Venezuela (Rosales *et al.*, 2011), mientras que en otros como México la seroprevalencia obtenida por IFI fue similar (Cantú-Martínez *et al.*, 2012).

En **Asia** la situación no es muy diferente a lo ya descrito para otros continentes. Algunos de los países en los que se detectó una mayor seroprevalencia son India, Mongolia y Turquía, al menos en los estudios de Sumbria *et al.* (2016b); Boldbaatar *et al.* (2005) y Akkan *et al.* (2003), respectivamente. La seroprevalencia fue similar en países como China (Xuan *et al.*, 2002), zonas de Mongolia (Munkhjargal *et al.*, 2013), Pakistán (Hussain *et al.*, 2014) o regiones de Turquía (Acici *et al.*, 2008), e inferior en Arabia Saudí (Alanazi *et al.*, 2012), ciertas áreas de China (Xu *et al.*, 2003), Emiratos Árabes Unidos (Jaffer *et al.*, 2010), Japón (Ikadai *et al.*, 2002), Jordania (Abutarbush *et al.*, 2012), Korea (Seo *et al.*, 2011), Tailandia (Kamyngkird *et al.*, 2014) y algunas zonas de Turquía (Karatepe *et al.*, 2009).

Son distintas las razones que explicarían el hecho de que existan diferencias entre estudios realizados en distintos países de diferentes continentes, y con las que estamos de acuerdo, por ejemplo, las diferencias entre las especies de garrapatas presentes en cada uno de estos países que podría deberse a diferencias climáticas (Kouam *et al.*, 2010; Grandi *et al.*, 2011; Steinman *et al.*, 2012; Sumbria *et al.*, 2016 a, 2016b; Guimarães *et al.*, 2016), la técnica diagnóstica empleada (Kouam *et al.*, 2010; Farkas *et al.*, 2013; García-Bocanegra *et al.*, 2013; Guidi *et al.*, 2015; Guimarães *et al.*, 2016), el número y distribución de muestras analizadas (García-Bocanegra *et al.*, 2013; Guimarães *et al.*, 2016) o bien el manejo de los animales muestreados (Kouam *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2013; Guidi *et al.*, 2015; Guimarães *et al.*, 2016).

A continuación, nos centraremos en los diferentes factores de riesgo que están implicados en la presencia de la PE.

En el estudio seroepidemiológico realizado mediante la técnica IFI, detectamos que el color de la capa no estaba relacionado con una mayor seropositividad de los caballos, a diferencia de lo que indicaron otros autores (Aharonson-Raz *et al.*, 2014). Es cierto que hay muy poca información relacionada con este factor de riesgo, por lo que se necesitaría ahondar más sobre ello.

Hemos demostrado que otros factores de riesgo de la PE sí estaban asociados significativamente con la seropositividad, como el origen geográfico. Constatamos que hay diferencia de seropositividad entre las diferentes comunidades autónomas analizadas, la cual oscila entre el 38,14% y el 67,54%. Podemos esgrimir los mismos argumentos para explicar las diferencias encontradas entre puntos geográficos de nuestro país que para las diferencias de seroprevalencia entre países, siendo especialmente relevante la diferente distribución de las especies de garrapatas, debida quizás a las diferencias climáticas entre zonas (Moretti *et al.*, 2010) y las distintas prácticas de manejo que pueden favorecer o no el contacto con garrapatas, como puede ser el hecho de pastar o pasear por el campo o bien el mantenimiento en boxes de los animales (Moretti *et al.*, 2010; Steinman *et al.*, 2012; Peckle *et al.*, 2013; Rapoport *et al.*, 2014; Davitkov *et al.*, 2016; Zanet *et al.*, 2017). Al igual que sucede en nuestro estudio, otros autores mostraron en numerosos países, que la procedencia geográfica era un factor de riesgo (Kerber *et al.*, 1999; Boldbaatar *et al.*, 2005; Asgarali *et al.*, 2007; Acici *et al.*, 2008; Karatepe *et al.*, 2009; Kouam *et al.*, 2010; Dos Santos *et al.*, 2011;

Seo *et al.*, 2011; Abutarbush *et al.*, 2012; Steinman *et al.*, 2012; García-Bocanegra *et al.*, 2013; Bartolomé del Pino *et al.*, 2016; Sumbria *et al.*, 2016b). Sin embargo, Asgarali *et al.* (2007) no encontraron una asociación significativa entre zonas geográficas distintas y la seroprevalencia, al menos para *T. equi*, aunque sí para *B. caballi*, siendo quizás el bajo número de muestras analizadas en dicha investigación, lo que explicaría este sesgo. Zanet *et al.* (2017) también indicaron que no existía relación entre parasitación y área geográfica, pero podría deberse a que las provincias donde se recogieron las muestras estuvieran muy próximas entre sí, por lo que compartirían un clima similar y, concomitantemente, las mismas especies de garrapatas.

Al analizar la influencia de la raza, constatamos que era un factor de riesgo, presentando menor seroprevalencia las razas autóctonas de la Península Ibérica (Pura Raza Español y Lusitano). Ello podría deberse a una mayor adaptación de estas razas a la presencia de cepas autóctonas del parásito debido a un contacto prolongado durante muchas generaciones y una evolución paralela. Ciertos autores también han demostrado una asociación significativa entre la raza y la presencia de estos parásitos (Sevinc *et al.*, 2008; Steinman *et al.*, 2012; Aharonson-Raz *et al.*, 2014; Bartolomé del Pino *et al.*, 2016). Otros indicaron que no hay relación entre la raza y la parasitación por *T. equi* (Golynski *et al.*, 2008; Bahrami *et al.*, 2014). Al igual que pasaba con el color de la capa, son pocos los estudios que hay sobre este factor de riesgo, por lo que sería interesante incluirlo en investigaciones futuras.

Si nos centramos en la edad como factor de riesgo, los resultados obtenidos por la prueba IFI confirmaron que los animales más jóvenes suelen mostrar más seronegatividad, aumentando progresivamente el porcentaje de seropositividad para ambos parásitos con la edad del caballo. Dicho porcentaje se estabiliza a una edad que oscilaba entre los 11 y los 14 años. A partir de los 11 años de edad, la seroprevalencia para *T. equi* fue bastante superior (44-65%) que para *B. caballi* (20-45%). Este mismo patrón fue descrito por otros autores (Vieira *et al.*, 2013). Al comparar los resultados obtenidos para *T. equi* mediante eELISA y mn-PCR, se demostró que la edad era un factor de riesgo, pues había más probabilidad de que un caballo entre 2 y 11 años fuera parasitado por este protozoo, porque tienen más posibilidades de entrar en contacto con garrapatas infectadas, como también refirieron otros autores (Rüegg *et al.*, 2007; Kouam *et al.*, 2010; Cantú-Martínez *et al.*, 2012; Zanet *et al.*, 2017; Camino *et al.*, 2018). Los

resultados obtenidos por IFI, mostraban que, hasta la edad de los 12 años, el factor edad estaba relacionado significativamente con la positividad a *B. caballi* (estudio II). Sin embargo, no se pudo demostrar que este factor estuviera asociado significativamente a la presencia de dicho parásito cuando se emplearon las técnicas cELISA y mn-PCR (estudio III). El diferente número de muestras (menor en estudio III) o la distribución de las muestras en los diferentes grupos de edad, son razones que podrían explicar estas discrepancias entre las técnicas usadas, como también señalaron Olivera y García (2001), Asgarali *et al.* (2007) y Vieira *et al.* (2013). Por lo tanto, los resultados obtenidos por las diferentes técnicas que hemos empleado, indicaron que la presencia de *T. equi* estaba relacionada con la edad, a diferencia de lo que sucedía en el caso de *B. caballi*, circunstancia que también destacaron Guidi *et al.* (2014) y Bartolomé del Pino *et al.* (2016) en sus trabajos. Este hecho tendría una explicación, pues sabemos que a medida que el animal envejece tiene más probabilidad de ser infectado debido al reiterado contacto con el ixódido vector. Máxime cuando se sabe que el sistema inmunitario del hospedador no es capaz de eliminar *T. equi*, y de este modo, los caballos se convierten en portadores crónicos de por vida. Además, no existe un tratamiento eficaz que consiga destruir este hemoparásito (de Waal y Van Heerden, 1994; Brüning, 1996, Asgarali *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2016). En el caso de *T. equi*, los animales tienen muchas posibilidades de reinfección debido a su transmisión transestadial. Por el contrario, *B. caballi* tiende a eliminarse de la sangre (de Waal y Van Heerden, 1994), detectándose menos positivos a medida que se analizan animales de mayor edad. Otros estudios demostraron que la edad no es un factor de riesgo como así lo indican Abutarbush *et al.* (2012) en Jordania; Cantú-Martínez *et al.* (2012) en Méjico, Ribeiro *et al.* (2013) en Portugal; Hussain *et al.* (2014) en Paquistán; Abedi *et al.* (2014) y Malekifard *et al.* (2014) en Irán; Acici *et al.* (2008) y Kizilarслан *et al.* (2015) en Turquía; Posada-Guzmán *et al.* (2015) en Costa Rica y Davitkov *et al.* (2016) en la región de los Balcanes. Numerosas son las razones que aportan los distintos autores para explicar el hecho de que en unas investigaciones se compruebe que la edad es un factor de riesgo y en otras no, entre estas razones cabe destacar el sesgo que puede provocar la diferencia en la cantidad de muestras analizadas en cada estudio, la distribución de animales en los distintos grupos de edad creados para el análisis estadístico o las distribuciones desequilibradas de las edades que se muestrean.

Respecto al sexo como factor de riesgo, los resultados de nuestros estudios (estudio II y III) indicaron que no influye en esta enfermedad cuando empleamos la técnica IFI y la mn-PCR para el diagnóstico. Sólo se mostró como un factor asociado significativamente a su presencia en el caso de emplear el test cELISA, y únicamente para *T. equi*, no para *B. caballi*. Por lo tanto, nuestros análisis determinaron en general, que, en igualdad de condiciones, el sexo del equino no sería realmente un factor de riesgo. Este hecho puede ser debido a las prácticas de manejo que se llevan a cabo en nuestro país, pues los animales jóvenes, ya sean machos o hembras, suelen criarse en el campo, aumentando las posibilidades de contacto con garrapatas y, por lo tanto, favoreciendo el contagio de la enfermedad independientemente del sexo. Otros muchos estudios realizados por diferentes autores, tanto fuera como dentro de Europa, coinciden con nosotros, demostrando que el sexo no es un factor de riesgo: Ribeiro *et al.* (2013) en Portugal, Farkas *et al.* (2013) en Hungría, Mujica *et al.* (2011) en Venezuela, Cantú-Martínez *et al.* (2012) en Méjico, Posada-Guzmán *et al.* (2015) en Costa Rica, Abutarbush *et al.* (2012) en Jordania, Munkhjargal *et al.* (2013) en Mongolia, Abedi *et al.* (2014) y Malekifard *et al.* (2014) en Irán, Karatepe *et al.* (2009) y Kizilarслан *et al.* (2015) en Turkía y Hussain *et al.* (2014) en Pakistán, entre otros. Sin embargo, otros estudios como los realizados por Rüegg *et al.* (2007), Moretti *et al.* (2010) y Guidi *et al.* (2014), sí determinaron que el sexo es un factor relacionado con la presencia de esta parasitación. En concreto, en estos trabajos se comprobó que los machos reproductores tienen menos posibilidades de contagio, pues no suelen pastar libremente en el campo, y por extensión, el contacto con garrapatas es más limitado. En cambio, otras investigaciones demostraron que los machos presentaban un nivel mayor de seropositividad (Sevinc *et al.*, 2008; Munkjargal *et al.*, 2013). La existencia de esta controversia, quizás fuera debida a diferencias en la forma de manejo o de las condiciones de alojamiento de los animales. Así, de acuerdo con lo que ya indicaban Shkap *et al.* (1998), el diferente manejo influiría en la presencia o ausencia de la enfermedad en individuos de diferente sexo. Es más, Botteon *et al.* (2002) demostraron que el sistema de crianza (extensivo, semiextensivo e intensivo) es un factor de riesgo asociado estadísticamente con la presencia de PE, y sería el pastoreo de los animales lo que favorecería su contagio (Abutarbush *et al.*, 2012).

En resumen, las discrepancias entre los resultados obtenidos en los trabajos incluidos en esta tesis y los de otras investigaciones, con respecto a factores de riesgo

tales como el sexo y la edad, podrían depender de los parámetros que se analizan en cada estudio como son el tamaño muestral, tipo de explotación y prácticas de manejo.

Finalmente, podemos resaltar que nuestras investigaciones revelaron (con un tamaño muestral considerablemente importante) que los factores realmente asociados con la presencia de esta enfermedad en la cabaña equina española fueron: la procedencia geográfica, raza y edad (este último fundamentalmente para *T. equi*). Otros factores como el sexo y el color de la capa no estuvieron asociados significativamente con la seroprevalencia obtenida.

### **6.3.- Desarrollo de la técnica PCR múltiple y anidada para el diagnóstico de la Piroplasmosis Equina**

Desde hace unos años, y cada vez con más frecuencia, se emplean técnicas de biología molecular como la PCR. Ciertos autores apoyan, además, el hecho de que la combinación de diferentes metodologías diagnósticas (moleculares y serológicas) es la manera más eficaz de diagnosticar la PE (Wise *et al.*, 2013).

Si nos centramos en concreto en las metodologías moleculares del ADN, la idea de combinar variantes de la PCR se ha venido empleado desde hace años, pues de esta manera se consigue aumentar la sensibilidad y especificidad. Una de las variantes que se ha probado es la PCR múltiple en tiempo real (mRT-PCR), que aplican autores como Heim *et al.* (2007). Ellos determinan que esta técnica es muy eficiente en la detección de animales enfermos, ya sea en fase aguda o crónica, mostrándose así, como una técnica útil para el diagnóstico. En dicho estudio se emplearon cebadores diseñados a partir de los genes *EMA-1* y *BC48 (RAP-1)*, cada uno de una especie diferente, esto es, un solo gen de cada especie.

También, con este objetivo (combinar ciertas variantes de la PCR para aumentar la eficacia de dicha técnica), unificamos la mPCR y la nPCR, técnica que se denominó PCR múltiple anidada (multinested PCR ó mn-PCR). La elección de la mPCR se hizo en base a que ciertos autores consultados (Alhassan *et al.*, 2005), indican que aporta una alta sensibilidad y muy buena especificidad cuando se aplica para la detección de los

piroplásmidos equinos y ha sido empleada con éxito por varios investigadores (Rüegg *et al.*, 2007; Rosales *et al.*, 2013; Abedi *et al.*, 2014; Malekifard *et al.*, 2014). Otros, por el contrario, indicaron que esta metodología no parece aumentar la sensibilidad del diagnóstico (Leal *et al.*, 2011). Con la elección y puesta a punto de la nPCR, se obtuvo un aumento, fundamentalmente, de la sensibilidad. Pero también de la especificidad (Carr *et al.*, 2010; Wanger *et al.*, 2017) de la propia mPCR y, por ende, de la nueva técnica que desarrollamos (mn-PCR). Esto se logró porque en la segunda fase nPCR se reduce la amplificación de fragmentos inespecíficos y se facilita la detección del parásito en muestras con pocas copias de la secuencia problema, algo que puede ser realmente útil, sobre todo para animales parasitados por *B. caballi* o para animales crónicos en general (Baldani *et al.*, 2008). Además, la PCR anidada requiere de un equipamiento convencional que es poco sofisticado, a diferencia de lo que ocurre con otras variantes, por ejemplo, la RT-PCR. Incluso, se ha demostrado que esta técnica (nPCR) puede detectar el parásito en infecciones recientes antes de lo que lo hacen las pruebas serológicas, las cuales necesitan de la presencia en circulación sanguínea de anticuerpos (Jaffer *et al.*, 2010).

La elección de los genes que se emplearon para el diseño de los cebadores de nuestra prueba se basó principalmente en dos criterios: (1) pertenecer al grupo de los genes que son empleados por un mayor número de autores (pues fundamentalmente seleccionamos los genes más empleados) y (2) aquellos con mayor cantidad de información molecular en la base de datos GenBank del NCBI (seleccionamos principalmente los genes con más secuencias disponibles para diseñar unos oligonucleótidos que permitiesen, en la medida de lo posible, amplificar el mayor número posible de cepas, es decir, se les exigía universalidad). Por ello, elegimos los genes que se detallan a continuación. Los tres primeros (*18S rRNA*, *EMA-1* y *RAP-1*) son los más empleados en la PCR. Además, *EMA-1* y *RAP-1* se han utilizado para la estandarización de la técnica cELISA como explican Knowles *et al.* (1991a) y Kappmeyer *et al.* (1999)

- Gen *18S rRNA*: Bashiruddin *et al.* (1999), Criado-Fornelio *et al.* (2003), Rampersad *et al.* (2003), Nagore *et al.* (2004), Alhassan *et al.* (2005), *et al.* (2008), Kim *et al.* (2008), Salim *et al.* (2008), Fritz, D. (2010), Kouam *et al.* (2010b), Sloboda *et al.* (2011), Seo *et al.* (2011), Ibrahim *et al.* (2011), Butler *et al.*

- al.* (2012), Laus *et al.* (2013), Qablan *et al.* (2013), Alanazi *et al.* (2014), Abedi *et al.* (2014), Gallusová *et al.* (2014) y Zanet *et al.* (2017).
- Gen *EMA-I*: Nicolaiewsky *et al.* (2001), Ueti *et al.* (2003), Alhassan *et al.* (2005), Alhassan *et al.* (2007b), Baldani *et al.* (2008), Motloang *et al.* (2008), Salim *et al.* (2008), Baptista *et al.* (2013), Ayala-Valdovinos *et al.* (2014) y Ebrahimi *et al.* (2018).
  - Gen *RAP-I*: Alhassan *et al.* (2005), Alhassan *et al.* (2007c), Heim *et al.* (2007), Salim *et al.* (2008), Motloang *et al.* (2008), Bhoora *et al.* (2010b) y Rapoport *et al.* (2014).
  - Gen de la  $\beta$ -*tubulina*: Cacciò *et al.* (2000) y Montes *et al.* (2017a). Este gen no se ha empleado mucho en el diagnóstico de piroplásmidos, pero decidimos usarlo porque ya habíamos trabajado exitosamente con él en el estudio I.
  - Gen *cytB*: añadir este gen de *T. equi* en el diseño de los cebadores fue razonable en base al mayor número de copias del material genético de la mitocondria en los eucariotas. En concreto, es un elemento extracromosómico, con un elevado número de copias disponibles para su amplificación, por lo que su uso aumentaría la sensibilidad de la prueba. Además, es un gen universal (siempre se localiza en las mitocondrias) como indican Tian *et al.* (2013), por lo que podría ser una de las opciones más acertadas para el diagnóstico de esta parasitosis.

Según los resultados del análisis de las 235 muestras del estudio III, podemos decir que en más del 90% de las muestras positivas a *T. equi* se evidenció el fragmento amplificado del gen de la  $\beta$ -*tubulina* (91,6%) y del gen *cytB* (90,3%), por lo que parecen ser bastante útiles en el diagnóstico de este hemoparásito. El uso de los cebadores de la  $\beta$ -*tubulina* en la detección de *B. caballi* también fue exitoso (en más del 75% de las muestras positivas se amplificó este gen). Por lo tanto, el uso de estos genes (menos empleados) creemos que está justificado y lo consideramos acertado según nuestro criterio. No tenemos constancia de que otros autores hayan empleado estos dos genes en el diagnóstico rutinario de *T. equi* y *B. caballi* o para la realización de estudios epidemiológicos.

Lobanov *et al.* (2018), han desarrollado recientemente una PCR que es cuantitativa y dúplex (dúplex qPCR). Y aunque es un procedimiento diferente, pues su técnica emplea una qPCR y la nuestra (mn-PCR) una nPCR, las dos son efectivas para

la detección de animales crónicos (Baldani *et al.*, 2008). Por otra parte, y quizás sea el dato más destacable, ambos estudios desarrollan una mPCR, aunque Lobanov *et al.* (2018) sólo emplean una pareja de cebadores para cada uno de los hemoparásitos a detectar, y por ello, no es una múltiple dentro de especies. En el trabajo de Lobanov *et al.* (2018), se usó el gen *EMA-1* para *T. equi* (con cebadores diseñados por los propios autores) y el gen *18S rRNA* para *B. caballus* (con cebadores diseñados por Bhoora *et al.*, 2010a). El primero de los genes es específico del citado parásito, el segundo es un gen presente en ambos parásitos y está muy conservado. Ambos fueron también elegidos para incluirlos en la mn-PCR por estas características, pero con cebadores diseñados para cada parásito cuando fue posible. Por ello, tanto los resultados obtenidos por Lobanov y sus colaboradores, como los nuestros, confirman que son técnicas muy satisfactorias en la detección de *T. equi*. Así, la mn-PCR detecta una prevalencia de este parásito de 65,96% en España, que es elevada, aunque no tanto como la detectada por Lobanov *et al.*, que se acerca al 90% en Brasil. En el caso de los resultados en Brasil, las prevalencias estarían en general en la línea de resultados obtenidos por otros autores, mientras que, en España la prevalencia sería superior a la encontrada por otros investigadores en trabajos seroepidemiológicos (datos mostrados en las tablas 3 y 6, apartado 2.5 de la presente tesis). Sin embargo, la dúplex qPCR no resultó tan exitosa para la infección por *B. caballus*, a diferencia de lo que sucedía con los resultados obtenidos por la mn-PCR, que fueron mejores en la amplificación de fragmentos de ADN de este parásito. Quizás los peores resultados obtenidos por Lobanov *et al.* (2018) derivan de que ellos no han profundizado tanto como nosotros en la investigación molecular, con el consiguiente riesgo de que los oligonucleótidos utilizados por dichos autores no sean tan efectivos.

En general, los investigadores que han empleado una mPCR lo hacen incorporando cebadores que amplifican uno sólo de los genes de cada parásito (Alhassan *et al.*, 2005; Rüegg *et al.*, 2007; Motloang *et al.*, 2008; Malekifard *et al.*, 2014; Davitkov *et al.*, 2016; Sumbria *et al.*, 2016; Guven *et al.*, 2017; Lobanov *et al.*, 2018), es más, la mayoría de ellos emplean los cebadores diseñados por Alhassan *et al.* (2005), basados únicamente en el gen *18S rRNA*. En nuestro caso fuimos más allá, usamos siete pares de cebadores, cuatro de estas parejas permitían la amplificación de ADN de cuatro genes distintos de *T. equi* (*18S rRNA*,  *$\beta$ -tubulina*, *EMA-1* y *cytB*) y tres de las parejas amplificaban otros tantos genes de *B. caballus* (*18S rRNA*,  *$\beta$ -tubulina* y *RAP-1*). La ventaja de emplear más marcadores genéticos consiste en que el ADN no es

una sustancia homogénea en los genes que pueda contener, por ello, cada vez que se pipetea una muestra del ADN problema diluido se puede recoger uno o varios genes del/de los parásito/s, sobre todo en parasitemias muy bajas. Esto es relevante fundamentalmente cuando las concentraciones aportan cantidades limitantes del ADN del parásito, que puede estar fuertemente diluido. Así, al emplear cebadores para un mayor número de genes, se incrementa la probabilidad de detectar uno cualquiera de esos genes y, con ello, más animales infectados, siendo más relevante esta afirmación para aquellos que sufren procesos crónicos. Además, salvo los cebadores “outer” empleados para detectar el gen *18S rRNA* en la primera fase de la mn-PCR, todos los demás han sido diseñados para desarrollar dicha prueba, a partir de toda la información genética disponible en la base de datos GenBank (secuencias mostradas en la tabla S1 del estudio III) y siempre seleccionando las zonas conservadas de las secuencias dentro de la misma especie con intención de coamplificar los dos parásitos, para posteriormente usar zonas no conservadas entre especies con intención de discriminar ambos protozoos.

Parece que la eficacia alcanzada con la mn-PCR es elevada, pues el porcentaje de detección de animales positivos es destacado (prevalencia total de 72,77%). Nuestros resultados evidencian una mayor prevalencia que la mostrada por otros estudios realizados en España (Camacho *et al.*, 2005; Habela *et al.*, 2005a; García-Bocanegra *et al.*, 2013; Camino *et al.*, 2016; Montes *et al.*, 2017b). Esta diferencia podría deberse al uso de distintas técnicas diagnósticas, ya que esos autores han empleado métodos serológicos (IFI o cELISA) y en el nuestro estudio (estudio III) se ha desarrollado una técnica diagnóstica molecular. La diferencia de sensibilidad y especificidad entre estos métodos (serológicos y moleculares) podría afectar a la prevalencia mostrada en dichos estudios. Estos datos son interesantes, pues la IFI es una técnica que se ha empleado mucho en España y es de referencia para la OIE (2014), al igual que lo es la cELISA, en el diagnóstico de animales que traspasan fronteras (por exportación o por la asistencia a eventos deportivos y/o exposiciones).

De acuerdo con la bibliografía consultada, es la primera vez que se diseña una PCR múltiple anidada con tanta cobertura, en lo que a número de genes amplificados se refiere, para el diagnóstico de la infección por *B. caballii* y *T. equi*, resultando ser muy efectiva en nuestro país.

## 6.4.- Comparación entre técnicas serológicas y moleculares de diagnóstico en Piroplasmosis Equina

El estudio comparativo entre las técnicas serológicas IFI y cELISA se justifica porque esta última técnica se está imponiendo como uno de los métodos diagnósticos oficialmente empleados en los laboratorios de países de todo el mundo, ya que se presupone de una elevada eficacia. Estudios previos aplicando el kit comercial cELISA (VMCR<sup>®</sup>, Inc. Pullman, WA, USA) en nuestros laboratorios (Montes, 2006), indicaron un bajo nivel de detección de anticuerpos frente a *B. caballi*, cuando se comparó con los resultados obtenidos por la técnica IFI. El número de muestras testadas por ambas técnicas en el estudio II rebasó la centena (n=108). El valor  $\kappa$  para *T. equi* ( $\kappa=0,68$ ) fue muy superior en comparación con el obtenido para *B. caballi* ( $\kappa=0,22$ ). Golynski *et al.* (2008) encontraron un valor del índice  $\kappa$  superior para *T. equi* ( $\kappa=0,87$ ) que el obtenido en nuestro estudio, pero mostrando, como nosotros, un porcentaje de positividad por IFI superior al obtenido mediante ELISA. Los datos obtenidos en el estudio de Kamyngkird *et al.* (2014) también apoyan esta última afirmación. Asimismo, otros autores (Shkap *et al.*, 1998) han indicado que hay una elevada concordancia entre ambas pruebas (IFI y cELISA), pero sin calcular el índice  $\kappa$ . Mahmoud *et al.* (2016), pese a determinar que no hay una diferencia estadística significativa entre la capacidad diagnóstica de la IFI y la cELISA, indicaron que la primera prueba era más efectiva que la segunda en el diagnóstico de *B. caballi*. La técnica cELISA, en comparación con otras técnicas serológicas, como la propia IFI, parece estar fallando en países como Egipto (Mahmoud *et al.*, 2016), Sudáfrica (Bhoora *et al.*, 2010b) y España, como ya hemos indicado (estudio II). Una de las explicaciones más lógica y simple sería la existencia de diferencias genéticas que afectan a la homología de los antígenos entre las cepas de cada país y las usadas para fabricar el kit cELISA. Esta afirmación tiene fundamento biológico si atendemos a que la cepa con la que se fabrica el kit es de origen americano. Además, de acuerdo con nuestro análisis filogenético (estudio III), las cepas americanas y mediterráneas fueron genéticamente divergentes. Ello sugiere la existencia de abundante diversidad genética entre cepas de *B. caballi*, lo cual estaría afectando al uso y validez universal del kit en relación a este parásito (volveremos a incidir en este hecho más adelante). Desde nuestro punto de vista, resulta lógico, pues el uso de antígeno autóctono para la IFI, tal y como nosotros hemos hecho, proporciona mayor capacidad

para el diagnóstico, como ya observaron otros autores (Kuttler *et al.*, 1988; Prochno *et al.*, 2014). Por este motivo, y de acuerdo con Mahmoud *et al.* (2016), sugerimos que la mejora del diagnóstico serológico de *B. caballi* pasa necesariamente, por emplear antígenos basados en genes distintos o bien pruebas diagnósticas alternativas al cELISA.

Respecto a la prevalencia total obtenida mediante el empleo de la mn-PCR en el estudio III (72,8%), se ha podido comprobar que es superior a la detectada por IFI (52%) en el estudio II. Esta diferencia podría explicarse por el hecho de que la mayoría de las muestras analizadas por mn-PCR (205/235) proceden de una sola área de muestreo, donde ya previamente habíamos comprobado la existencia de una alta seroprevalencia (empleando la técnica IFI). Mientras que las 3100 muestras analizadas en el estudio seroepidemiológico provenían de distintas áreas situadas en diferentes provincias de varias regiones de la geografía española, por lo tanto, de distintos tipos de explotaciones, con diversas formas de manejo y con prevalencias dispares entre ellas. Otra razón que explicaría la diferencia de prevalencias entre la mn-PCR y la IFI, sería la distinta sensibilidad y especificidad existente entre las técnicas moleculares y serológicas, como ya indicábamos anteriormente.

De nuevo, y tal y como sucedió con las técnicas serológicas cELISA e IFI, el porcentaje de positividad obtenido mediante mn-PCR para *T. equi*, resultó superior que para *B. caballi*, por lo que podemos afirmar que *T. equi* es más prevalente (independientemente de la técnica diagnóstica empleada). Otros muchos autores han descrito esta misma situación en distintos países del mundo empleando diferentes técnicas diagnósticas (resultados detallados en las tablas de la 1 a la 6 del apartado 2.5 de la presente tesis). Las razones de este hecho ya las hemos explicado anteriormente. Sin embargo, una minoría de autores, informaron que la situación en sus estudios era inversa, siendo *B. caballi* más prevalente que *T. equi* (Xuan *et al.*, 2001c; Ikadai *et al.*, 2002; Asgarali *et al.*, 2007; Acici *et al.*, 2008; Moretti *et al.*, 2010; Kerber *et al.*, 2011; Mujica *et al.*, 2011; Butler *et al.*, 2012; Laus *et al.*, 2013; Rosales *et al.*, 2013; Munkhjargal *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Mans *et al.*, 2015). De acuerdo con Mujica *et al.* (2011), la razón que justificaría esta diferencia de prevalencia, podría ser la mayor presencia de ciertas especies de garrapatas que serían más adecuadas para la transmisión de *B. caballi*.

La comparación de la mn-PCR con la técnica cELISA fue de gran relevancia, pues ya habíamos constatado a través de la comparación IFI vs. cELISA resultados demasiado pobres en el diagnóstico de *B. caballi* en nuestro país. De ahí la necesidad de contrastar los resultados entre estos dos métodos diagnósticos (cELISA y mn-PCR). Los resultados obtenidos de esta comparación, confirmaban que la concordancia para estas dos pruebas frente a los antígenos de *T. equi* era elevada ( $\kappa=0,83$ ), siendo superior a la encontrada entre la IFI y la cELISA ( $\kappa=0,68$ ). Farkas *et al.* (2013) hicieron una comparación entre cELISA y PCR convencional, obteniendo un valor del índice  $\kappa$  semejante al nuestro ( $\kappa=0,80$ ). Sin embargo, para *B. caballi* detectamos una concordancia muy baja ( $\kappa=0,06$ ), y por ello, el kit parecía mostrar una baja fiabilidad en el diagnóstico de este parásito. Nuestros resultados con respecto a *B. caballi*, coinciden con los de otros autores en países como Sudáfrica (Bhoora *et al.*, 2010b), Israel (Rapoport *et al.*, 2014) o Egipto (Mahmoud *et al.*, 2016), resultados que evidenciaron que el diagnóstico de *B. caballi* no resulta muy eficaz al emplear el kit cELISA comercial. Otros autores, por el contrario, observaron que la eficacia del kit comercial parece ser mejor para *T. equi* y/o *B. caballi*, que otras pruebas diagnósticas como la propia PCR. En este sentido, cabe citar los trabajos de Abutarbush *et al.* (2012) en Jordania; Baptista *et al.* (2013) en Portugal y las islas Azores; Posada-Guzmán *et al.* (2015) en Costa Rica; Mahdy *et al.* (2016) en Egipto; Sumbria *et al.* (2016b) en India y Lobanov *et al.* (2018) en Brasil. Bartolomé del Pino *et al.* (2016) testan las muestras positivas por cELISA también por RT-PCR, demostrando que no todas las muestras positivas por cELISA lo eran también por RT-PCR. Una explicación al hecho de que no coincidan los resultados de técnicas serológicas y moleculares en estos estudios, sería que los kits comerciales de cELISA emplean anticuerpos monoclonales y proteínas recombinantes sintetizados a partir de la información genética procedente de los genes *EMA-1* (*T. equi*) y *RAP-1* (*B. caballi*). Si dichos anticuerpos y proteínas no se sintetizan a partir de genes genéticamente conservados, el kit comercial podría no estar detectando adecuadamente algunas de las variantes genéticas de estos parásitos nativos de cada país y/o continente.

Lobanov *et al.* (2018), compararon su mPCR (dúplex qPCR) con el kit comercial cELISA. En este trabajo demostraron que había un acuerdo sustancial para ambas pruebas con respecto a *T. equi* ( $\kappa=0,62$ ), inferior al obtenido en nuestro trabajo ( $\kappa=0,83$ ). Lo que indicaría que tanto la cELISA como la mn-PCR detectan este parásito

en nuestro país de una manera más eficaz. Sin embargo, respecto a *B. caballi*, el valor del índice  $\kappa$  es bastante similar, pues obtienen un resultado sólo ligeramente superior ( $\kappa=0,127$ ) al obtenido en nuestro estudio ( $\kappa=0,06$ ), que en ambos casos es insignificante (Landis y Koch, 1977). Esta falta de acuerdo tiene su causa más importante en una diferencia en la eficacia diagnóstica entre las pruebas serológicas y moleculares en relación a *B. caballi*. Así, el kit comercial no es muy efectivo en España (3,8% de sueros positivos), mientras que la mn-PCR sí lo es (29,4% de positividad). En Brasil, sin embargo, la dúplex qPCR muestra una menor eficacia (7,9% casos positivos) a diferencia de lo que ocurre con el cELISA, que detecta índices superiores de positividad (58,6%). Estas discrepancias señalan a nuestro favor, que la ineficacia de los oligonucleótidos empleados quizás podría evitarse utilizando más de un gen por especie cuando las cepas a detectar en cada país acumulan variación molecular en genes particulares, como hemos visto que sucede en el gen *RAP-1*. Los buenos resultados mostrados por el kit comercial cELISA en el estudio llevado a cabo por Lovanov *et al.* (2018), nos sugiere, como ya hemos explicado anteriormente, que este kit comercial cELISA estaría bien diseñado para el diagnóstico de las cepas de *B. caballi* de origen americano y no sería el más adecuado para la detección de otras originarias de países distintos, como España.

Por otra parte, Coultous *et al.* (2018) compararon una serie de técnicas serológicas (RFC, IFI y kit comercial cELISA) con una nPCR (testando más de 1000 muestras procedentes del Reino Unido). En ningún caso calcularon el acuerdo entre dichas técnicas, pero basándose en el porcentaje de positividad (seroprevalencia y prevalencia) indicaron que las técnicas serológicas eran más efectivas que la molecular, puesto que la seroprevalencia para *T. equi* fue del 8,0% y la prevalencia del 0,8%. Para *B. caballi* la seroprevalencia fue del 4,4% y no se detectó ningún caso positivo mediante nPCR. El hecho de que los métodos serológicos sean más eficaces que los moleculares (a diferencia de lo que muestra nuestro estudio) podría deberse de nuevo, a la ineficacia en la amplificación realizada por los cebadores empleados por estos autores, puesto que podrían no estar diseñados de forma adecuada para las cepas a detectar, y el empleo de una mPCR ayudaría a evitar dicha ineficacia, como ya hemos indicado anteriormente.

Mahdy *et al.* (2016) compararon diferentes métodos para el diagnóstico de *T. equi*, como fueron la nPCR y la cELISA, concluyendo que la cELISA detectaba una menor positividad que la nPCR con significación estadística, tal y como sucede en nuestro estudio (estudio III).

Finalmente, podemos indicar que, tras la comparación realizada entre las diferentes técnicas diagnósticas (IFI vs. cELISA y cELISA vs. mn-PCR), hemos observado que las discrepancias surgen fundamentalmente, entre la técnica serológica cELISA y la técnica molecular mn-PCR en el diagnóstico de *B. caballi*. Ello de nuevo apunta, a la necesidad del desarrollo de una prueba cELISA más específica, teniendo en cuenta los hallazgos filogenéticos expuestos anteriormente (estudio III).

Por último, y para cerrar este capítulo de discusión, sólo queda hacer especial hincapié, en que una de las finalidades más importantes de esta tesis doctoral ha sido la de desarrollar la técnica mn-PCR descrita anteriormente. Resaltar que es una técnica novedosa y efectiva, como demuestran los porcentajes de positividad que arroja. Es una metodología molecular que puede contribuir de una forma muy significativa al diagnóstico de la PE en España, por sí misma o bien en combinación con métodos serológicos, haciendo válido lo que indican otros investigadores (Moretti *et al.*, 2010; Laus *et al.*, 2013; Rapoport *et al.*, 2014; Sgorbini *et al.*, 2015; Mahdy *et al.*, 2016). La aportación que hacemos dentro del ámbito del diagnóstico molecular, permitirá afrontar la detección de animales infectados (con independencia del curso de enfermedad) con una mayor fiabilidad, muy relevante en el caso de portadores crónicos. Esto también repercutirá favorablemente en la confianza de compradores procedentes del extranjero en ambas direcciones (exportación/importación), evitando la propagación de esta enfermedad entre regiones, países o incluso continentes. Esta técnica podría abrir puertas para el desarrollo de alguna otra metodología quizás, si cabe, más eficaz, al aportar diferentes juegos de cebadores, todos ellos eficaces tanto para diagnosticar *T. equi* como *B. caballi*. Sea como fuere, creemos que se ha hecho una aportación importante a la mejora del diagnóstico de esta hemoparasitosis.

## **7.- Conclusiones**

---

---



- Se han aportado, por primera vez, secuencias genéticas de los genes de la  $\beta$ -*tubulina* y *RAP-1* de *B. caballi* de cepas españolas, demostrándose gran variabilidad genética en esta especie. Se confirmó, además, la existencia de estas diferencias genéticas entre las cepas de origen mediterráneo y las de otras procedencias. Ello denota que el conocimiento genético de este hemoparásito es aún incompleto. Nuestro trabajo demuestra la necesidad de profundizar en estos aspectos genéticos, lo que ayudaría a mejorar la sensibilidad y especificidad de las técnicas diagnósticas a emplear y, de este modo, contribuir al control de la PE.
- En base a los resultados obtenidos en este estudio estamos en condiciones de considerar a España como un país endémico de PE. Esta endemidad se puede calificar como inestable, lo que conlleva a la aparición de casos clínicos y sugiere tomar medidas oportunas de bioseguridad a la hora de realizar cualquier movimiento de animales de zonas aparentemente libres a zonas de riesgo o viceversa.
- La prevalencia obtenida para *T. equi* fue superior a la de *B. caballi*, independientemente del método de diagnóstico empleado, particularmente, en el centro y sur de España. Hacia el norte peninsular parece que la presencia de ambos parásitos tiende a equilibrarse.
- En nuestro estudio demostramos que son varios los factores de riesgo asociados a la presencia de la PE, destacando como principales: la localización geográfica, la raza y la edad, esta última especialmente significativa en el caso de infección por *T. equi*.
- Hemos desarrollado una metodología de diagnóstico molecular innovadora, la mn-PCR, eficaz para el diagnóstico de la PE, tanto en fase aguda como crónica y válida con independencia de la procedencia de los animales, así como de las diferentes líneas genéticas del parásito implicado en cada caso.
- Los resultados que muestran las comparaciones IFI vs. cELISA y cELISA vs. mn-PCR, estarían indicando que el kit comercial cELISA empleado no es muy eficaz en el diagnóstico de la infección por *B. caballi*. Ello apuntaría a que, en el caso de usar el kit, se estaría subestimando la infección por *B. caballi* en España.



## **8.- Agradecimientos**

---



Son muchas las personas a quienes tengo que agradecer su ayuda, porque, de un modo u otro, me han brindado su colaboración y apoyo para poder terminar esta tesis doctoral.

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres su apoyo incondicional, sin ellos, sin su fuerza y su cariño, nunca habría conseguido terminar. Gracias, os quiero muchísimo. El resto de mi familia también ha sido un pilar muy importante sobre el que apoyarme, especialmente en los momentos tan difíciles por los que he tenido que pasar para finalizar esta tesis.

Igualmente, mis amigos han sido fundamentales para mí en todos estos años. Agradecer la amistad y el respaldo de María y José, en especial a ti, María, que me has ayudado y escuchado cuando lo he necesitado. Todas esas conversaciones al teléfono y en persona, así como tus ánimos fueron muy importantes para mí. Sonia, sé que me has dado muchos consejos, que siempre has deseado lo mejor para mí y te lo agradezco infinitamente. Trini, hemos recorrido muchos kilómetros juntas en busca de sangres y garrapatas, nos hemos reído mucho y hemos disfrutado de nuestra mutua compañía, gracias por esos momentos tan maravillosos. Nani, tus comentarios me han elevado la moral en muchas ocasiones, sé que me aprecias sinceramente y lo recordaré de por vida. Enrique, Matilde, Laura, Luis, Leticia, Mayi y Javier, constantemente me preguntábais por mi tesis, mis artículos, me escuchábais y con eso era suficiente para seguir adelante, gracias.

Siempre he encontrado buenos amigos en los institutos en los que he trabajado, personas muy válidas que me han animado a terminar mi tesis doctoral. Recuerdo con mucho cariño las veces que expliqué a Juanfran lo que era una PCR y cómo nos reíamos “pecerriendo”. Asun y Ángela, compañeras del IES Profesor Hernández Pacheco, me alentaron a seguir adelante, por ese “calvario”, como lo describía Ángela, que es la tesis doctoral. A mis compañeros y amigos del IES Ágora les debo mucho. Carolina, Mariluz, Inmaculada y Pepe, profes de inglés, siempre estaban dispuestos a corregirme todos los textos que les daba escritos en la lengua de Shakespeare. Los auxiliares de conversación Brendan y Grant fueron también muy importantes para mí, sobre todo Grant. Recuerdo que me decías una y otra vez: “termina la tesis, porque, aunque puedas hacerte un master no es lo mismo...”. Manuel, tú sabes lo que es el mundo universitario y siempre me has apoyado en todas las decisiones que tomaba. Me escuchabas y eso, a

veces, es lo único que se necesita. Gracia y Mila, me ayudasteis a reflexionar sobre lo que quería y lo que no, eso tiene un valor incalculable para mí.

De ninguna manera puedo olvidarme de los Profesores Titulares del área de Parasitología, los Doctores D<sup>a</sup>. Eva M<sup>a</sup> Frontera Carrión, D. Luis Carlos Gómez Nieto, D. David Reina Esojo, D. Francisco Javier Serrano Aguilera y D. Juan Enrique Pérez Martín. Eva, nos conocemos desde hace muchos años, eres una persona muy vitalista que contagia esa alegría a los demás, ha sido fantástico tener trato contigo. Carlos, siempre me has echado una mano cuando la he necesitado, sobre todo si tenía que utilizar algún equipo “de los tuyos” para trabajar, gracias. Y gracias también por haber aceptado, cuando te lo propuse, ser parte del tribunal de mi tesis doctoral. Fran, me has echado un “cable” con la estadística muchas veces (y mira que suele ser ardua...), pero siempre lo has hecho sin dudar, eso me facilitaba mucho las cosas, por ello, quiero decirte de corazón, gracias. Enrique, cada vez que me he acercado a tu despacho me has atendido de buen grado y has conversado conmigo de forma amigable, gracias. David, eres una persona magnífica, me alegro que aceptaras formar parte de mi tribunal de tesis tan de buen grado, pese al trabajo que sabes que te da serlo. Tengo que agradecerte que me hayas recibido tantas veces en tu despacho con una sonrisa en la cara y tuvieras un rato para charlar conmigo. Siempre dispuesto a escuchar y ayudar, gracias infinitas por ello, no te puedes ni imaginar lo que eso suponía para mí. No cambies nunca.

Gracias también a los directores de esta tesis doctoral, el Dr. D. Miguel Ángel Habela Martínez-Estélez y el Dr. D. José Luis Fernández García, por la ayuda que me han proporcionado para terminar este trabajo.

Los compañeros del área de Parasitología también me han apoyado mucho, gracias en especial a Rafa y a Dani. Creo que el enfrentarse a una tesis hace que los compañeros se comprendan y se unan más entre sí, pues este reto es muy duro y los que pasamos por ello sabemos lo que implica. Rafa, además, aceptaste ser tribunal de mi tesis doctoral, gracias por haberlo hecho. También se hicieron muchos viajes conmigo alumnos internos del área de Parasitología, lo recordaré siempre. No quiero olvidarme tampoco de Virginia, Javi, Silvia, Isabel y Victoria, del grupo Leishmanceres, gracias por esas charlas y los ánimos que me habéis dado. Quiero destacar de Isabel su encomiable disposición a ayudar a los demás. David, desde hace unos años formas parte

del personal laboral del área de Parasitología, siempre que te he necesitado has estado ahí. Todavía me acuerdo de cómo pusimos en marcha ese lavador de placas de ELISA entre los dos. Gracias porque siempre estás para lo que se necesita y, siempre de buen grado.

No puedo dejar de agradecer la colaboración mostrada por diferentes veterinarios que me han ayudado a recoger las muestras, en especial a Rocío Delgado, José Manuel Fruto y Javier Mota. Por supuesto, no quiero olvidarme de todos los ganaderos y particulares que han colaborado en este estudio y, sin cuya cooperación, este trabajo no se habría realizado. Deseo hacer una mención especial a Paco Chacón, pues me ha abierto las puertas de su yeguada desde hace años, tanto, que he considerado esas instalaciones casi como mi casa. Gracias por tu ayuda, no lo olvidaré. También, destacar la aportación realizada por el personal de la yeguada Centurión de Segovia, pues nos facilitaron todas las muestras que pedimos. Gracias por vuestra buena disposición. Agradecer también la colaboración de la Yeguada Hermanos Vara Muñoz-Casillas de Olivenza y todas aquellas distribuidas por prácticamente toda España, y que nos enviaron muestras para ser analizadas.

De nuevo, gracias a todos, porque sin vuestra colaboración, ayuda y/o apoyo no habría logrado terminar esta tesis doctoral.



## **9.- Bibliografía**

---



## A

- Abedi, V., Razmi, G., Seifi, H. y Naghibi, A. (2014)** “Molecular and serological detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses and ixodid ticks in Iran”, *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5(3), pp. 239-244.
- Abutarbush, S.M., Alqawasmeh, D.M., Mukbel, R.M. y Al-Majali, A.M. (2012)** “Equine Babesiosis: seroprevalence, risk factors and comparison of different diagnostic methods in Jordan”, *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(1), pp. 72-78.
- Acici, M., Umur, S., Guvenc, T., Arslan, H.H. y Kurt, M. (2008)** “Seroprevalence of equine babesiosis in the Black Sea region of Turkey”, *Parasitology International*, 57(2), pp. 198-200.
- Adaszek, Ł., Górna, M., Krzysiak, M., Adaszek, M., Garbal, M. y Winiarczyk, S. (2011)** “Identification of the piroplasms isolated from horses with clinical piroplasmosis in Poland”, *Wiadomości Parazytologiczne*, 57(1), pp. 21-26.
- Aharonson, K., Rapoport, A., Hawari, I.M., Lensky, I.M., Berlin, D., Zivotofsky, D., Klement, E. y 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 and Tick-borne Diseases*, 5(4), pp. 366-372.
- Akkan, H.A., Karaca, M., Tutuncu, M., Deger, S., Keles, I. y Agaoglu, Z. (2003)** “Serologic and microscopic studies on babesiosis in horses in the eastern border of Turkey”, *The Journal of Parasitology*, 5(23), pp. 181-183.
- Alanazi, A.D., Alyousif, M.S. y Hassieb, M.M. (2012)** “Seroprevalence study on *Theileria equi* and *Babesia caballi* antibodies in horses from central province of Saudi Arabia”, *The Journal of Parasitology*, 98(5), pp. 1015-1017.
- Alanazi, A.D., Said, A.E., Morine-Adeline, V., Alyousif, M.S. y Slapeta, J. (2014)** “Quantitative PCR detection of *Theileria equi* using laboratory workflows to detect asymptomatic persistently infected horses”, *Veterinary Parasitology*, 206(3-4), pp. 138-145.
- Alhassan, A., Pumidonming, W., Okamura, M., Hirata, H., Battsetseg, B., Fujisaki, K., Yokoyama, N. e Igarashi, I. (2005)** “Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood”, *Veterinary Parasitology*, 129(1-2), pp. 43-49.

- Alhassan, A., Thekisone, O.M., Yokoyama, N., Inoue, N., Motloang, M.Y., Mbatia, P.A., Yin, H., Katayama, Y., Anzai, T., Sugimoto, C. e Igarashi, C. (2007a)** “Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmosis”, *Veterinary Parasitology*, 143(2): 155-160.
- Alhassan, A., Iseki, H., Kim, C., Yokoyama, N. e Igarashi, I. (2007b)** “Comparison of polymerase chain reaction methods for the detection of *Theileria equi* infection using whole blood compared with pre-extracted DNA samples as PCR templates”, *Tropical Animal Health and Production*, 39(5), pp. 369-374.
- Alhassan, A., Govind, Y., Tam, N.T., Thekiso, O.M., Yokoyama, N., Inoue, N. e Igarashi, I. (2007c)** “Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and *in vitro* cultivation methods for the diagnosis of equine piroplasmosis”, *Parasitology Research*, 100(5), pp. 1165-1168.
- Ali, S., Sugimoto, C., Matsuda, M., Sugiura, T., Kanemaru, T., Onuma, M. y Kamada, M. (1993)** “Protein characterization of *Babesia equi* piroplasm isolated from infected horse erythrocytes”, *Parasitology Research*, 79(8), pp. 639-643.
- Al-Saad, K.M., Al-Saad, E.A. y Al-Derawie, H.A. (2010)** “Clinical diagnostic study of equine babesiosis in drought horses in some areas of Basrah province”, *Research Journal of Animal Sciences*, 4(1), pp. 16-22.
- Allsopp, B.A., Baylis, H.A., Allsopp, M.T., Cavalier-Smith, T., Bishop, R.P., Carrington, D.M., Sohanpal, B. y Spooner, P. (1993)** “Discrimination between six species of *Theileria* using oligonucleotide probes which detect small subunit ribosomal RNA sequences”, *Parasitology*, 107(Pt2), pp. 157-165.
- Allsopp, M.T., Cavalier-Smith, T., de Waal, D.T. y Allsopp, B.A. (1994)** “Phylogeny and evolution of the piroplasms”, *Parasitology*, 108(Pt2), pp. 147-152.
- Allsopp, M.T. y Allsopp, B.A. (2006)** “Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081, pp. 509-517.
- Allsopp, M.T., Lewis, B.D. y Penzhorn, B.L. (2007)** “Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals”, *Veterinary Parasitology*, 148(2), pp. 130-136.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997)** “BLASTN 2.2.20 (Ver. Feb-08-2009) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”, *Nucleic Acids Research*, 25(17), pp. 3389-3402.

- Apanaskevich, D.A., Santos-Silva, M.M. y Horak, I.G. (2008)** “The genus *Hyalomma* Kock, 1884. IV. Redescription of all parasitic stages of *H. (Euhyalomma) lusitanicum* Koch, 1884 and the adults of *H. (E) franchinii* Tonelli Rondelli, 1932 (Acari: Ixodidae) with a first description of its immature stages”, *Folia Parasitologica*, 55(1), pp. 61-74.
- Arroyo, M.I., Morales, G.P., Sosa, P.A., Carmona-Fonseca, J., Maestre, A. (2008)** “Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de *Plasmodium*: nueva técnica diagnóstica”, *Médicas UIS*, 21(3), pp. 158-175.
- Asgarali, Z., Coombs, D.K., Mohammed, F., Campbell, M.D. y Caesar, E. (2007)** “A serological study of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in thoroughbreds in Trinidad”, *Veterinary Parasitology*, 144(1-2), pp. 167-171.
- Assasian, O. y Stanek, G. (2002)** “Theobald Smith - the discoverer of ticks as vectors of disease”, *The Wiener Klinische Wochenschrift*, 114(13-14), pp. 479-481.
- Atlas, R.M. y Bej, A.K. (1994)** “Polymerase Chain Reaction” in Gerhardt, P. (Ed.) *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington D.C.: American Society for Microbiology, pp. 418-435.
- Avarzed, A., de Waal, D.T., Igarashi, I., Saito, A., Oyamada, T., Toyoda, Y. y Suzuki, N. (1997a)** “Prevalence of equine piroplasmiasis in Central Mongolia”, *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 64(2), pp. 141-145.
- Avarzed, A., Igarashi, I., Kanemaru, T., Hirumi, K., Omata, T., Saito, A., Oyamada, T., Nagasawa, H., Toyoda, Y. y Suzuki, N. (1997b)** “Improved *in vitro* cultivation of *Babesia caballi*”, *Journal of Veterinary Medical Science*, 59(6), pp. 479-481.
- Ayala-Valdovinos, M.A., Lemus-Flores, C., Galindo-García, J., Sánchez-Chipres, D., Duifhuis-Rivera, T., Anguiano-Estrella, R., Bañuelos-Pineda, J. y Rodríguez-Carpena, J.G. (2014)** “Nested PCR detection of *Theileria equi* infection and frequency in horses imported into Mexico”, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 13(14), pp. 859-863.
- Ayala-Valdovinos, M.A., Lemus-Flores, C., Galindo-García, J., Bañuelos-Pineda, J., Rodríguez-Carpena, J.G., Sánchez-Chiprés, D. y Duifhuis-Rivera, T. (2017)** “Diagnosis and prevalence of *Theileria equi* in western Mexico by nested PCR”, *Parasitology International*, 66(1), pp. 821-824.

## B

- Bahrami, S., Ghardrdan, A.R., Mirabdollahi, S.M. y Fayed, M.R. (2014)** “Diagnosis of subclinical equine theileriosis in center of Iran using parasitological and molecular methods”, *Tropical Biomedicine*, 31(1), pp. 110-117.
- Baldani, C.D., Machado, R.Z., Botteon, P.T., Tasakura, F.S. y Massard, C.L. (2004)** “An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG antibodies against *Babesia equi* in horses”, *Ciência Rural*, 34(5), pp. 1525-1529.
- Baldani, C.D., Machado, R.Z., Raso, T.F. y Pinto, A.A. (2007)** “Serodiagnosis of *Babesia equi* in horses submitted to exercise stress”, *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 27(4), pp. 179-183.
- Baldani, C.D., Canola, P.A., Neto, J.C. y Machado, R.Z. (2008)** “*In vitro* culture, PCR and nested PCR for the detection of *Theileria equi* in horses submitted to exercise”, *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60(3), pp. 550-558.
- Baldani, C.D., Hilario, E., Nakaghi, A.C., Bertolini, M.C. y Machado, R.Z. (2011)** “Production of recombinant *EMA-1* protein and its application for the diagnosis of *Theileria equi* using an enzyme immunoassay in horses from Sao Paulo State, Brazil”, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 20(2), pp. 54-60.
- Balkaya, I. y Erdoğmuş, S.Z. (2006)** “Investigation of prevalence of *Babesia equi* (Laveran, 1901) and *Babesia caballi* (Nuttal, 1910) in horses by serological methods in Elaziğ and Malatya Province”, *Firat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 20(1), pp. 61-63.
- Bahrami, S., Ghardrdan, A.R., Mirabdollahi, S.M. y Fayed, M.R. (2014)** “Diagnosis of subclinical equine theileriosis in center of Iran using parasitological and molecular methods”, *Tropical Biomedicine*, 31(1), pp. 110-117.
- Bandelt, H.J., Forster, P. y Röhl, A. (1999)** “Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies”, *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), pp. 37-48.
- Baneth, G., Florin-Christensen, M., Cardoso, L. y Schnittger, L. (2015)** “Reclassification of *Theileria annae* as *Babesia vulpes* sp. Nov”, *Parasites & Vectors*, 8(1), 207. Disponible en:  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4393874/pdf/13071\\_2015\\_Article\\_830.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4393874/pdf/13071_2015_Article_830.pdf) (Consultado: 15 de agosto de 2018).

- Baptista, C., Lopes, M.S., Tavares, A.C., Rojer, H., Kappmeyer, L., Mendonça, D. y da Câmara Machado, A. (2013)** “Diagnosis of *Theileria equi* infections in horses in the Azores using cELISA and nested PCR”, *Ticks and Tick-borne Diseases*, 4(3), pp. 242-245.
- Barbosa, I.P., Böse, R., Peymann, B. y Friedhoff, K.T. (1995)** “Epidemiological aspects of equine babesiosis in a herd of horses in Brazil”, *Veterinary Parasitology*, 58(1-2), pp. 1-8.
- Barbosa A.M., Fernández-García, J.L. y Carranza, J. (2009)** “A new Marker for rapid sex identification of red deer (*Cervus elaphus*)”, *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 20(2), pp. 169-172.
- Bartolomé del Pino, L.E., Nardini, R., Veneziano, V., Iacoponi, F., Cersini, A., Autorino, G.L., Buono, F. y Sicluna, M.T. (2016)** “*Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Central-Southern Italy: sero-molecular survey and associated risk factors”, *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7(3), pp. 462-469.
- Bashiruddin, J.B., Cammà, C. y Rebêlo, E. (1999)** “Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the *16S rRNA* gene”, *Veterinary Parasitology*, 84(1), pp. 75-83.
- Battsetseg, B., Xuan, X., Ikadai, H., Bautista, J.L., Byambaa, B., Boldbaatar, D., Battur, B., Battsetseg, G., Batsukh, Z., Igarashi, I., Nagasawa, H., Mikami, T. y Fujisaki, K. (2001)** “Detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in *Dermacentor nuttalli* adult ticks”, *International Journal for Parasitology*, 31(4), pp. 384-386.
- Battsetseg, B., Lucero, S., Xuan, X., Clavería, F.G., Inoue, N., Alhassan, A., Kanno, T., Igarashi, I., Nagasawa, H., Mikami, T. y Fujisaki, K. (2002a)** “Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction”, *Veterinary Parasitology*, 107(4), pp. 351-357.
- Battsetseg, B., Lucero, S., Xuan, X., Clavería, F.G., Byambaa, B., Battur, B., Boldbaatar, D., Batsukh, Z., Khaliunaa, T., Battsetseg, G., Igarashi, I., Nagasawa, H. y Fujisaki, K. (2002b)** “Detection of equine *Babesia spp.* gene fragments in *Dermacentor nuttalli* Olenov 1929 infesting Mongolian horses and their amplification in egg and larval progenies”, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 64(8), pp. 727-730.

- Benavides, E. y Rodríguez, L.E. (2009)** “Epidemiología y control de enfermedades febriles anemizantes de los équidos en Colombia”, *Revista de Investigaciones en Ciencias Animales Spei Domus*, 5(11), pp. 20-31.
- Bhoora, R., Franssen, L., Oosthuizen, M.C., Guthrie, A.J., Zweygarth, E., Penzhorn, B.L., Jongejan, F. y Collins, N.E. (2009)** “Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa”, *Veterinary Parasitology*, 159(2), pp. 112-120.
- Bhoora, R., Quan, M., Franssen, L., Butler, C.M., van der Kolk, J.H., Guthrie, A.J., Zweygarth, E., Jongejan, F. y Collins, N.E. (2010a)** “Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses from South Africa”, *Veterinary Parasitology*, 168(3-4), pp. 201-211.
- Bhoora, R., Quan, M., Matjila, P.T., Zweygarth, E., Guthrie, A.J. y Collins, N.E. (2010b)** “Sequence heterogeneity in the gene encoding the rho-trypan-associated protein-1 (*RAP-1*) of *Babesia caballi* isolates from South Africa”, *Veterinary Parasitology*, 169(3-4), pp. 279-288.
- Bhoora, R., Quan, M., Matjila, P.T., Zweygarth, E., Guthrie, A.J. y 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 assay for the detection of *T. equi*”, *Veterinary Parasitology*, 172(1-2), pp. 33-45.
- Bier, O.G., Siqueira, M. y Esteves, M.B. (1968)** “Quantitative studies of complement fixation. I. A simplified and accurate procedure based on 50 percent hemolytic endpoint”, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 10(4), pp. 199-208.
- Blouin, E.F. y de Waal, D.T. (1989)** “The fine structure of developmental stages of *Babesia caballi* in the salivary glands of *Hyalomma truncatum*”, *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 56, pp. 189-195.
- Blood, D.C., Henderson, J.A. y Radostis, O.M. (1982)** *Medicina Veterinaria*. 5ª ed. México D.F.: Interamericana.
- Boldbaatar, D., Xuan, X., Battsetseg, B., Igarashi, I., Battur, B., Batsukh, Z., Bayambaa, B. y Fujisaki, K. (2005)** “Epidemiological study of equine piroplasmiasis in Mongolia”, *Veterinary Parasitology*, 127(1), pp. 29-32.
- Boenigk, J., Wodniok, S. y Glücksman, E. (2015)** *Biodiversity and Earth History*. Heidelberg: Springer-Verlag.

- Bonfini, B., Semproni, G. y Savini, G. (2006)** “Use of *in vitro* culture system to detect *Theileria equi* strains from infected equids and/or reservoirs”, *Veterinaria Italiana*, 42(3), pp. 217-223.
- Böse, R. y Daemen, K. (1992)** “Demonstration of the humoral immune response of horses to *Babesia caballi* by Western blotting”, *International Journal for Parasitology*, 22(5), pp. 627-630.
- Böse, R., Peymann, B. y Barbosa, I.P. (1994)** “Identification of diagnostic antigens for South American *Babesia caballi* infections”, *International Journal for Parasitology*, 24(2), pp. 255-258.
- Böse, R. y Hentrich, B. (1994)** “Identification of antigens diagnostic for European isolates of *Babesia equi* by two-dimensional electrophoresis and Western blotting”, *Parasitology Research*, 80(3), pp. 182-185.
- Böse, R. y Peymann, B. (1994)** “Diagnosis of *Babesia caballi* infections in horses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blot”, *International Journal for Parasitology*, 24(3), pp. 341-346.
- Böse, R., Jorgensen, W.K., Dalgliesh, R.J., Friedhoff, K.T. y de Vos, A.J. (1995)** “Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis”, *Veterinary Parasitology*, 57(1-3), pp. 61-74.
- Botteon, P.T., Massard, C.L., Botteon, R.D., Loss, Z.G. y Linhares, G.F. (2002)** “Seroprevalence of *Babesia equi* in three breeding systems of equines: Rio de Janeiro-Brazil”, *Parasitología Latinoamericana*, 57(3-4), pp. 141-145.
- Braga, M.S., Costa, F.N., Gomes, D.R., Xavier, D.R., André, M.R., Gonçalves, L.R., Freschi, C.R. y Machado, R.Z. (2017)** “Genetic diversity of piroplasmids species in equids from island of São Luis, northeastern Brazil”, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 26(3), pp. 331-339.
- Bretagne, S., Costa, J.M., Besmond, C., Carsique, R., Calderone, R. (1997)** “Microsatellite polymorphism in the promoter sequence of the elongation factor 3 gene of *Candida albicans* as the basis for a typing system”, *Journal of Clinical Microbiology*, 35(7), pp. 1777-1780.
- Brüning, A. (1996)** “Equine piroplasmiasis: an update on diagnosis, treatment and prevention”, *The British Veterinary Journal*, 152(2), pp. 139-151.
- Brüning, A., Phipps, P., Posnett, E. y Canning, E.U. (1997)** “Monoclonal antibodies against *Babesia caballi* and *Babesia equi* and their application in serodiagnosis”, *Veterinary Parasitology*, 68(1-2), pp. 11-26.

- Butler, C.M., Nijhof, A.M., van der Kolk, J.H., de Haseth, O.B., Taoufik, A., Jongejan, F. y Houwers, D.J. (2008)** “Repeated high dose imidocarb dipropionate treatment did not eliminate *Babesia caballi* from naturally infected horses as determined by PCR-reverse line blot hybridization”, *Veterinary Parasitology*, 151(2-4), pp. 320-322.
- Butler, C.M., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M., Stout, T.A., van der Kolk, J.H., Wollenberg, L.V., Nielen, M., Jongejan, F., Werners, A.H. y Houwers, D.J. (2012)** “Prevalence of the causative agents of equine piroplasmiasis in the South West of The Netherlands and the identification of two autochthonous clinical *Theileria equi* infections”, *The Veterinary Journal*, 193(2), pp. 381-385.

## C

- Cacciò, S., Cammà, C., Onuma, M. y Severini, C. (2000)** “The  $\beta$ -tubulin gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is an informative marker for species discrimination”, *International Journal for Parasitology*, 30(11), pp. 1181-1185.
- Caeiro, V.M. (1992)** “As carraças em Portugal: seus hospedeiros domesticos e silvestres. Ciclos vitais, preferências de vegetação e de clima”, *Médico Veterinario*, 28, pp. 7-25.
- Calero, R. (2011)** *Contribución de los métodos serológicos y moleculares al conocimiento de la epidemiología de Toxoplasma gondii en Extremadura*. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura.
- Camacho, A.T., Guitian, F.J., Pallas, E., Gestal, J.J., Olmeda, A.S., Habela, M.A., Telford, S.R. 3rd y Spielman, A. (2005)** “*Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* Infections in Horses in Galicia, Spain”, *Tropical Animal Health and Production*, 37(4), pp. 293-302.
- Camino, E., Carvajal, K.A., Lozano, F.J., Viñolo, C., Alende, T., Domínguez, L. y Cruz, F. (2016)** “Estudio de seroprevalencia de piroplasmiasis equina en España en muestras previas a la exportación” en *XXI Simposio Anual AVEDILA 2016*. Murcia, 17-18 de noviembre de 2016. Disponible en: <https://www.visavet.es/es/estudio-de-seroprevalencia-de-piroplasmiasis-equina-en-espana-en-muestras-previas-a-la-exportacion/34=2371/> (Consultado: 08 de noviembre de 2018)

- Camino, E., de la Cruz, M.L., Domínguez, L., Carvajal, K.A., Fores, P., de Juan, L. y Cruz-López, F. (2018)** “Epidemiological situation of the exposure to agents causing equine piroplasmiasis in Spanish Purebred horses in Spain: seroprevalence and associated risk factors”, *Journal of Equine Veterinary Science*, 67, pp. 81-86.
- Canola, P.A., Oliveira, R., Baldani, C.D. y Machado, R.Z. (2007)** “Estudo comparativo entre técnicas de extração de DNA e realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico de *Theileria equi* e *Babesia caballi*”, *Ars Veterinaria*, 23(3), pp. 165-171.
- Cantú-Martínez, M.A., Segura-Correa, J.C., Silva-Páez, M.L., Avalos-Ramírez, R. y Wagner, G.G. (2012)** “Prevalence of antibodies to *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from northeastern Mexico”, *The Journal of Parasitology*, 98(4), pp. 869-870.
- Carbonell, E. y Soler, R. (2018)** “Diccionario etimológico de protistología”, *Nereis: Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación*, 10, pp. 177-195.
- Carr, J., Williams, D.G. y Hayden, R.T. (2010)** “Molecular detection of multiple respiratory viruses” in Nakamura, R.M., Kiechle, F.L., Grody, W.W., Strom, C.M. (eds.) *Molecular diagnostics: Techniques and applications for the clinical laboratory*. Amsterdam: Academic Press Inc., pp. 289-300.
- Casati, S., Sager, H., Gern, L. y Piffaretti, J.C. (2006)** “Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes Ricinus* in Switzerland”, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 13(1), pp. 65-70.
- Catcott, E. y Smithcors, J. (1972)** “Babesiosis” in *Equine Medicine and Surgery*. 2<sup>nd</sup> ed. Wheaton, IL: American Veterinary Publications Inc., pp. 137-155.
- Centeno-Lima, S., do Rosário, V., Parreira, R., Maia, A., Freudenthal, A.M., Nijhof, A.M. y Jongejan, F. (2003)** “A fatal case of human babesiosis in Portugal: molecular and phylogenetic analysis”, *Tropical Medicine & International Health*, 8(8), pp. 760-764.
- Center for Food Security and Public Health (CFSPH) (2006)** *Peste equina africana*. Disponible en:  
[http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/peste\\_equina\\_africana.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/peste_equina_africana.pdf)  
(Consultado: 04 de septiembre de 2018).
- Cha, R.S. y Thilly, W.G. (1993)** “Specificity, efficiency and fidelity of PCR”, *PCR Methods and Applications*, 3(Suppl.3), pp. 18-29.

- Chae, J.S., Lee, J.M., Kwon, O.D., Holman, P.J., Waghela, S.D. y Wagner, G.G. (1998)** “Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene variable (V4) region among and within geographic isolates of *Theileria* from cattle, elk and white-tailed deer”, *Veterinary Parasitology*, 75(1), pp. 41-52.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O. y Maladrin, L. (2009)** “*Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission”, *Veterinary Research*, 40(2), 37. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2695028/pdf/vetres-40-37.pdf> (Consultado: 18 de septiembre de 2018).
- Chevrier, I., Soule, C. y Dorchies, P.H. (1979)** “Les piroplasmoses équine inapparentes”, *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 52, pp. 37-45.
- Chhabra, S., Ranjan, R., Uppal, S.K. y Singla, L.D. (2012)** “Transplacental transmission of *Babesia equi* (*Theileria equi*) from carrier mares to foals”, *Journal of Parasitic Disease*, 36(1), pp. 31-33.
- Cohen, J. (1960)** “A coefficient of agreement for nominal scales”, *Educational and Psychological Measurement*, 20, pp. 37-46.
- Coletto, L. (1999)** “Equine babesiosis: a disease linked to the extensive horse raising in the pasture land of Extremadura (“Dehesa”)” in *Dynamics and sustainability of Mediterranean pastoral system (Cahiers options méditerranéennes). 9<sup>th</sup> Meeting of the Mediterranean Sub-Network of the FAO-CIHEAM Inter-Regional Cooperative Research and Development Network on Pastures and Fodder Crops, 1997/11/26-29, Badajoz (España)*. Badajoz, 26-29 de noviembre de 1997. Zaragoza: Etienne, M., pp. 273-276.
- Cordero del Campillo, M. (1974)** “Sobre las babesiosis de los équidos en España”, *Revista Ibérica de Parasitología*, 34(3-4), pp. 305-315.
- Cordero del Campillo, M., Manga-González, M.Y. y González, C. (1980)** “Protozoos I” en *Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos*. Madrid: Ministerio de Sanidad y Seguridad Social, pp. 15-84.
- Coultous, R.M., Phipps, P., Dalley, C., Lewis, J., Hammond, T.A., Shiels, B.R., Weir, W. y Sutton, D.G. (in press)** “Equine piroplasmosis status in the UK: an assessment of laboratory diagnostic submissions and techniques”, *Veterinary Record*. doi: <http://dx.doi.org/10.1136/vr.104855> (Consultado: 18 de diciembre de 2018).

- Criado-Fornelio, A., Martínez-Marcos, A., Buling-Saraña, A. y Barba-Carretero, J.C. (2003a)** “Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects”, *Veterinary Parasitology*, 113(3-4), pp. 189-201.
- Criado-Fornelio, A., Martínez-Marcos, A., Buling-Saraña, A. y Barba-Carretero, J.C. (2003b)** “Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history”, *Veterinary Parasitology*, 114(3), pp. 173-194.
- Criado-Fornelio, A., Martínez-Marcos, A., Buling-Saraña, A. y Barba-Carretero, J.C. (2003c)** “Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study”, *Veterinary Microbiology*, 93(4), pp. 307-317.
- Criado-Fornelio, A., González-del-Río, M.A., Buling-Saraña, A. y Barba-Carretero, J.C. (2004)** “The “expanding universe” of piroplasms”, *Veterinary Parasitology*, 119(4), pp. 337-345.
- Criado, A., Martínez, J., Buling, A., Barba, J.C., Merino, S., Jefferies, R. e Irwin, P.J. (2006)** “New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and *cytochrome b* genes”, *Veterinary Parasitology*, 142(3-4), pp. 238-247.
- Cunha, C.W., da Silva, SS., Pimentel, C.A. y Dapper, Y. (1996)** “Avaliação da frequência de equinos soropositivos à *Babesia equi* no Jóquei Clube de Pelotas e em dois haras da zona sul do Rio Grande do Sul, RS”, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 5(2), pp. 119-122.

## D

- Dahiya, R., Salar, R.K., Mandal, K.D., Kumar, R., Tripathi, B.N., Pal, Y. y Kumar, S. (2018)** “Risk factors analysis associated with *Theileria equi* infected equines in semi-arid and sub-humid ecological enzootic zones of India”, *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 12(4), pp. 17-21.
- Dalrymple, B.P., Peters, J.M., Böse, R. y Wright, I.G. (1996)** “A polymerase chain reaction method for the identification of the Bv60/p58 Family of Rhoptry protein homologues in the genus *Babesia*”, *Experimental Parasitology*, 84(1), pp. 96-100.

- Davitkov, D., Vucicevic, M., Stevanovic, J., Krstic, V., Slijepcevic, D., Glavinic, U. y Stanimirovic, Z. (2016)** “Molecular detection and prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses of central Balkan”, *Acta Parasitologica*, 61(2), pp. 337-342.
- De Campos, C.H., Prado, R.F., Guimarães, A., da Silva, A.T., Baldani, C.D., Cordeiro, M.D., Pires, M.S., Peixoto, M.P., dos Santos, H.A., Machado, R.A., Fonseca, A.H. y Massard, C.L. (2013)** “Aspectos epidemiológicos e soroprevalência de *Theileria equi* em equinos de uso militar no município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, Brasil”, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 35(Suppl.2), pp. 106-112.
- De Vos, A.J. y Jorgensen, W.K. (1991)** “Bovine babesiosis” in *Manual of recommended diagnostic techniques and requirements for biological products*. Vol. III. Paris: Office International des Epizooties, pp. 1-14.
- De Vera, M., Guillén, A.T., García, F., Contreras, R., Sierralta, A. y León, E. (2006)** “Seroprevalencia de la babesiosis equina en caballos purasangre de carrera alojados en los hipódromos de la rinconada y nacional de Valencia, Venezuela”, *Veterinaria Tropical*, 31(1-2), pp. 43-52.
- De Waal, D., van Heerden, J. y Potgieter, F. (1987)** “An investigation into clinical pathological changes and serological response in horses experimentally infected with *Babesia equi* and *Babesia caballi*”, *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 54(4), pp. 561-568.
- De Waal, D., van Heerden, J., van den Berg, S., Slegmann, G. y Potgieter, F. (1988)** “Isolation of pure *Babesia equi* and *Babesia caballi* organisms in splenectomized horses from endemic areas in South Africa”, *Veterinary Research*, 55(1), pp. 33-35.
- De Waal, D. (1992)** “Equine piroplasmiasis: a review”, *The British Veterinary Journal*, 148(1), pp. 6-14.
- De Waal, D.T. y van Heerden, J. (1994)** “Equine Piroplasmiasis” in *Infectious Diseases of Livestock with special reference to south Africa*. New York, NY: Oxford University Press, pp. 295-304.
- De Waal, D. (2012)** “Advances in diagnosis of protozoan diseases”, *Veterinary Parasitology*, 189(1), pp. 65-74.

- Dennig, H.K. (1966)** “Serological investigation concerning *Babesia equi*” in Corradetti, A. (Ed.) *Proceedings of the First International Congress of Parasitology: Roma, 21-26 september 1964*. Roma, September 21-26, 1964. Oxford: Pergamon Press, Cop., pp. 262-265.
- Díaz-Sánchez, A.A., Pires, M.S., Estrada, C.Y., Cañizares, E.V., del Castillo, S.L., Cabezas-Cruz, A., Rivero, E.L., da Fonseca, A.H., Massard, C.L. y Corona-González, B. (2018)** “First molecular evidence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Cuba”, *Parasitology Research*, 117(10), pp. 3109-3118.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M. y Dveksler, G.S. (1993)** “General concepts for PCR primers design”, *PCR Methods and Applications*, 3(Suppl.3), pp. 30-37.
- Department of Agriculture, Forestry and Fisheries of Republic of South Africa (DAFF) (2016)** *Biliary fever in horses*. Disponible en: [http://www.nda.agric.za/vetweb/History/H\\_Diseases/H\\_Animal\\_Diseases\\_in%20SA6.htm](http://www.nda.agric.za/vetweb/History/H_Diseases/H_Animal_Diseases_in%20SA6.htm) (Consultado: 14 de noviembre de 2018).
- Dolan, T.T. (1989)** “Theileriosis: a comprehensive review”, *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 8(1), pp. 59-78.
- Donnelly, J., Joyner, L.P., Graham-Jones, O. y Ellis, C.P. (1980a)** “A comparison of the complement fixation and immunofluorescent antibody tests in a survey of the prevalence of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horses in the Sultanate of Oman”, *Tropical Animal Health and Production*, 12(1), pp. 50-60.
- Donnelly, J., Joyner, L.P. y Frank, C. (1980b)** “Quantitative epidemiological studies on the prevalence of babesiosis in horses in Kuwait”, *Tropical Animal Health and Production*, 12(4), pp. 253-258.
- Donnelly, J., Phipps, L.P. y Watkins, K.L. (1982)** “Evidence of maternal antibodies to *Babesia equi* and *Babesia caballi* in foals of seropositive mares”, *Equine Veterinary Journal*, 14, pp. 126-128.
- Dorchies, P.H. (1976)** “Piroplasmoses equines latentes. A propos de l'incident de Montreal”, *Revue de Médecine Vétérinaire*, 127(11), pp. 1523-1528.
- Dos Santos, T.M., Roier, E.C., dos Santos, H.A., Pires, M.S., Vilela, J.A., Moraes, L.M., Almeida, F.Q., Baldani, C.D., Machado, R.Z. y Massard, C.L. (2011)** “Factors associated to *Theileria equi* in equids of two microregions from Rio de Janeiro, Brazil”, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 20(3), pp. 235-241.

## E

- Ebrahimi, M., Adinehbeigi, K., Hamidinejat, H., y Tabandeh, M.R. (2018)** “Molecular characterization of *Theileria equi* infection in horse populations belonging to West Azerbaijan, Iran: insights into the importance of Equine Merozoite Antigen (*EMA-1*) in its diagnosis”, *Annals of Parasitology*, 64(1), pp. 21-27.
- Ellis, J., Hefford, C., Baverstock, P.R., Dalrymple, B.P. y Johnson, A.M. (1992)** “Ribosomal DNA sequence comparison of *Babesia* and *Theileria*”, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 54, pp. 87-96.
- El-Sayed, S.A., Rizk, M.A., Mousa, A., El Said, E.S., El-Sayed, G., Fouda, M., Yokoyama, N. e Igarashi, I. (2015)** “Cocktail of *Theileria equi* antigens for detecting infection in equines”, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(12), pp. 977-981.
- Encinas, A. (1986)** “Ticks of the Province of Salamanca (Central/NW Spain)”, *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 61(1), pp. 95-107.
- Erbsiöh, J. (1975)** “Babesiosis in the reborn foal”, *Journal of Reproduction and Fertility*, 23(Suppl.1), pp. 725-726.
- Escalante, H., Huamanchay, O. y Davelois, K. (2001)** “La inmunocromatografía para el diagnóstico de la infección por *Taenia solium* en *Mesocricetus auratus* mediante la detección de coproantígenos”, *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 18(3-4), pp. 56-62.
- Estrada-Peña, A. (1994)** *Las garrapatas en España: introducción*. Junta de Castilla y León, Consejería de Sanidad y Bienestar Social.

## F

- Farkas, R., Tanczos, B., Gyurkovszky, M., Fölsvári, G., Solymosi, N., Edelhofer, R. y Hornok, S. (2013)** “Serological and molecular detection of *Theileria equi* infection in horses in Hungary”, *Veterinary Parasitology*, 192(1-3), pp. 143-148.
- Fernández-García, J.L. (2012)** “The endangered *Dama dama mesopotamica*: genetic variability, allelic loss and hybridization signals”, *Contributions to Zoology*, 81(4), pp. 223-233.

- Ferreira, E.P., Vidotto, O., Almeida, J.C., Ribeiro, L.P., Borges, M.V., Pequeno, W.H., Stipp, D.T., de Oliveira, C.J., Biondo, A.W., Vieira, T.S. y Vieira, R.F. (2016)** “Serological and molecular detection of *Theileria equi* in sport horses of northeastern Brazil”, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 47, pp. 72-76.
- Figuroa, J.V. y Buening, G.M. (1995)** “Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick-borne hemoparasites of veterinary importance”, *Veterinary Parasitology*, 57(1-3), pp. 75-92.
- Forster, P., Torroni, A., Renfrew, C. y Röhl, A. (2001)** “Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution”, *Molecular Biology and Evolution*, 18(10), pp. 1864-1881.
- Frerichs, W.M., Holbrook, A.A. y Johnson, A.J. (1969)**. “Equine piroplasmosis: complement fixation titers of horses infected with *Babesia caballi*”, *American Journal of Veterinary Research*, 30(5), pp. 697-702.
- Friedhoff, K.T. (1982)** “The piroplasms of equidae: significance for the international equine trade”, *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 95(19), pp. 368-374.
- Friedhoff, K.T., Tenter, A.M. y Müller, I. (1990)** “Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses”, *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 9(4), pp. 1187-1194.
- Friedhoff, K.T. y Soulé, C. (1996)** “An account on equine babesiosis”, *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 15(3), pp. 1191-1201.
- Fritz, D. (2010)** “A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008)”, *Parasitology Research*, 106(6), pp. 1339-1342.

## G

- Gallusová, M., Qablan, M.A., D'Amico, G., Oborník, M., Petrželková, K.J., Mihalca, A.D. y Modrý, D. (2014)** “Piroplasms in feral and domestic equines in rural areas of the Danube Delta, Romania, with survey of dogs as a possible reservoir”, *Veterinary Parasitology*, 206(3-4), pp. 287-292.

- García, M.J. (2010)** *Identificación molecular de las especies de piroplasmas en las poblaciones de ixódidos de la comunidad autónoma del País Vasco. Distribución y prevalencia de Babesia y Theileria en los ungulados domésticos y silvestres.* Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.
- García-Bocanegra, I., Arenas-Montes, A., Hernández, E., Adaszek, L., Carbonero, A., Almería, S., Jaén-Téllez, J.A., Gutiérrez-Palomino, P. y Arenas, A. (2013)** “Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids”, *The Veterinary Journal*, 195(2), pp. 172-178.
- Georges, K., Newaj-Fyzul., Campbell, M., Mootoo, N., Sparagano, O. y Ezeokoli, C.D. (2006)** “The application of PCR and Reverse Line Blot hybridization to detect tick-borne haemopathogens of companion animals and racehorses in Trinidad” in *Innovation: reshaping veterinary epidemiology: ISVEE XI: handbook & abstracts: 1-6 August 2006, Cairns Convention Centre, Queensland, Australia.* Cairns, August 1-6, 2006. Queensland: International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, p. 605.
- Georges, K.C., Ezeokoli, C.D., Sparagano, O., Pargass, I., Campbell, M., D’Abadie, R. y Yabsley, M.J. (2011)** “A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad”, *Veterinary Parasitology*, 175(3-4), pp. 363-366.
- Gerstenberg, C., Allen W.R. y Phipps, L.P. (1999)** “Mechanical transmission of *Babesia equi* infection in a British herd of horses” in Wernery, U. (Ed.) *Equine Infectious Diseases VIII: Proceedings of the Eighth International Conference, Dubai, 23<sup>rd</sup>-26<sup>th</sup> March 1998.* Dubai, March 23-26, 1998. Newmarket: R&W Publications, pp. 217-222.
- Gil, J., Guillén, A.T. y Zapatero, L.M. (1979)** “Claves para la identificación de los Ixodoidea españoles (Adultos)”, *Revista Ibérica de Parasitología*, 39, pp. 129-138.
- Gimenez, C., Casado, N., Criado-Fornelio, A., de Miguel, F.A. y Domínguez-Peñafiel, G. (2009)** “A molecular survey of Piroplasmida and Hepatozoon isolated from domestic and wild animals in Burgos (northern Spain)”, *Veterinary Parasitology*, 162(1-2), pp. 147-150.

- Golynsky, A.A., Fernandes, K.R., Baldai, C.D., Golynsky, A.L., Madeiro, A.S., Machado, R.Z., Botteon, P. de T. y 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”, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(Suppl.1), pp. 317-321.
- González, F.J. (2011)** “Anemia Infecciosa Equina (AIE): presentación de un cuadro clínico”, *Revista Electrónica Veterinaria*, 12(10), pp. 1-12.
- Götz, F. (1982)** *Untersuchungen über die Brauchbarkeit von ELISA, IFAT, IHA, und KBR zum Nachweis von Babesia equi Infektionen*. Thesis. University of Munich.
- Grandi, G., Molinari, G., Tittarelli, M., Sassera, D. y Kramer, L.H. (2011)** “Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses from northern Italy”, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(7), pp. 955-956.
- Grause, J.F., Ueti, M. W., Knowles, D.P., Kappmeyer, L.S. y Bunn, T.O. (2013)** “Efficacy of imidocarb dipropionate in eliminating *Theileria equi* from experimentally infected horses”, *The Veterinary Journal*, 196(3), pp. 541-546.
- Gubbels, J.M., de Vos, A.P., van der Weide, M., Viseras, J., Schouls, L.M., de Vries, E. y Jongejan, F. (1999)** “Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization”, *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), pp. 1782-1789.
- Guglielmone, A.A. (1995)** “Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America”, *Veterinary Parasitology*, 57(1-3), pp. 109-119.
- Güçlü, H.Z. y Karaer, K.Z. (2007)** “Detection of *Babesia caballi* (Nuttall, 1910) and *Theileria equi* (Syn. *Babesia equi*, Laveran, 1901) by the polymerase chain reaction (PCR) in show and sport horses in the region of Ankara”, *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 31(2), pp. 89-93.
- Guidi, E., Pradier, S., Lebert, I. y 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”, *Parasitology Research*, 114(1), pp. 71-83.
- Guimarães, A.M., Lima, J.D. y Ribeiro, M.F. (1998)** “Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*”, *Parasitology Research*, 84(4), pp. 323-327.
- Guimarães, A.M., Lima, J.D. y Ribeiro, M.F. (2003)** “Ultrastructure of *Babesia equi* trophozoites isolated in Minas Gerais, Brazil”, *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 23(3), pp. 101-104.

- Guimarães, A.M., Bruhn, F.R., Ribeiro, M.F., Figueredo, M.H., García, A., Rocha, C.M. y Rocha, I. (2017)** “Prevalence and risk factors of *Theileria equi* infection in horses in Minas Gerais, Brazil”, *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 3-4, pp. 18-22.
- Güven, E., Avcioglu, H., Deniz, A., Balkaya, İ., Abay, U., Yavuz, Ş. y Akyüz, M. (2017)** “Prevalence and molecular characterization of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in jereed horses in Erzurum, Turkey”, *Acta Parasitologica*, 62(1), pp. 207-213.
- Grandi, G., Molinari, G., Tittarelli, M., Sassera, D. y Kramer, L.H. (2011)** “Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses from northern Italy”, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(7), pp. 955-956.

## H

- Habela, M.A., Reina, D., Nieto, C.G., Verdugo, S.G. y Navarrete, I. (1989)** “Epidemiología de la babesiosis equina en Extremadura: estudio preliminar”, *Medicina Veterinaria*, 6(1), pp. 31-39.
- Habela, M.A., Grande, A., Antón, J.M., Mora, J.A., Moreno, F. y Pérez-Martín, J.E. (1995)** “Aportaciones al conocimiento de la distribución y clínica de la babesiosis equina en España” en libro de resúmenes del *IV Congreso Ibérico de Parasitología*. Santiago de Compostela, 24-28 de julio de 1995. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela, p. 116.
- Habela, M.A., Antón, J.M., Peña, J., Corchero, E. y Alcalde, E. (1998a)** “Nuevos datos acerca de la epidemiología de la piroplasmosis equina en España” en libro de resúmenes del *IV Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y Enfermedades transmitidas (IV SISIET)*. Setúbal, 24-26 de septiembre de 1998. Setúbal: Bertrand, p. 89.
- Habela, M.A., Peña, J., Corchero, E. y Sevilla, R.G. (1998b)** *Garrapatas y hemoparásitos transmitidos, de interés veterinario en España. Manual práctico para su identificación*. Madrid: Schering-Plough Animal Health.
- Habela, M.A., Sevilla, R.G., Corchero, E. y Peña, J. (2000)** “Diagnóstico y tratamiento de la Piroplasmosis Equina”, *Mundo Ganadero*, 127, pp. 62-68.

- Habela, M.A., Gragera-Slikker, A., Moreno, A., Montes, G. y Sevilla, R. (2005a)** “Piroplasmosis equina: conocimiento y grado de concienciación de los productores de caballos Pura Raza Española”, *Revista Equinus*, 11, pp. 17-34.
- Habela, M.A., Gragera-Slikker, A., Moreno, A., Montes, G. y Sevilla, R.G. (2005b)** “Aportaciones al conocimiento de las especies de garrapatas de los équidos y su distribución en España”, *Revista Equinus*, 13, pp. 9-26.
- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E.M. y Troedsson, C. (2014)** “Characterization of the *18S rRNA* gene for designing universal eukaryote specific primers”, *PloS One*, 9(2), e87624. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0087624&type=printable> (Consultado: 16 septiembre de 2018).
- Hailat, N.Q., Lafi, S.Q., Al-Darraji, A.M. y Al-Ani, F.K. (1997)** “Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan”, *Veterinary Parasitology*, 69(1-2), pp. 1-8.
- Hall, C.M., Busch, J.D., Scoles, G.A., Palma-Cagle, K.A., Ueti, M.W., Kappmeyer, L.S. y 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. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3606381/pdf/1756-3305-6-35.pdf> (Consultado: 15 de septiembre de 2018).
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. y Williams, P.M. (1996)** “Real-time PCR quantitative PCR”, *Genome Research*, 6(10), pp. 986-994.
- Heim, A., Passos, L.M., Ribeiro, M.F., Costa-Júnior, L.M., Bastos, C.V., Cabral, D.D., Hirzmann, J. y Pfister, K. (2007)** “Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil”, *Parasitology Research*, 102(1), pp. 63-68.
- Herwaldt, B.L., Cacciò, S., Gherlinzoni, F., Aspöck, H., Slemenda, S.B., Piccaluga, P., Martinelli, G., Edelhofer, R., Hollenstein, U., Poletti, G., Pampiglione, S., Löschenberger, K., Tura, S. y Pieniazek, N.J. (2003)** “Molecular characterization of a Non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic Babesiosis in Europe”, *Emerging Infectious Diseases*, 9(8), pp. 942-948.
- Heuchert, C.M., de Giulli V. Jr., de Athaide, D.F., Böse, R. y Friedhoff, K.T. (1999)** “Seroepidemiologic studies in *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil”, *Veterinary Parasitology*, 85(1), pp. 1-11.

- Hikosaka, K., Watanabe, Y., Tsuji, N., Kita, K., Kishine, H., Arisue, N., Palacpac, N.M., Kawazu, S., Sawai, H., Horii, T., Igarashi, I. y Tanabe, K. (2010)** “Divergence of the mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*”, *Molecular Biology and Evolution*, 27(5), pp. 1107-1116.
- Hirata, H., Ikadai, H., Yokoyama, N., Xuan, X., Fujisaki, K., Suzuki, N., Mikami, T. e Igarashi, I. (2002)** “Cloning of a truncated *Babesia equi* gene encoding an 82-kilodalton protein and its potential use in an enzyme-linked immunosorbent assay”, *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4), pp. 1470-1474.
- Hirata, H., Xuan, X., Yokoyama, N., Nishikawa, Y., Fujisaki, K., Suzuki, N. e Igarashi, I. (2003)** “Identification of a specific antigenic region of the P82 protein of *Babesia equi* and its potential use in serodiagnosis”, *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2), pp. 547-551.
- Hirato, K., Ninomiya, N., Uwano, Y. y Kutii, T. (1945)** “Studies on the complement fixation reaction for equine piroplasmiasis”, *Japanese Journal of Veterinary Science*, 7, pp. 204-205.
- Holbrook, A.A., Johnson, A.J. y Madden, B.S. (1968)** “Equine piroplasmiasis: intraerythrocytic development of *Babesia caballi* (Nuttall) and *Babesia equi* (Laveran)”, *American Journal of Veterinary Research*, 29, pp. 297-303.
- Holbrook, A.A. (1969)** “Biology of equine piroplasmiasis”, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 155(2), pp. 453-454.
- Holbrook, A.A., Cooperrider, D.E., Roby, T.O., Kirkham, W.W. y Martin, W.H. (1972)** “Protocol for the complement fixation test for equine piroplasmiasis” in *Proceedings of the 75<sup>th</sup> Annual Meeting of the United States Animal Health Association*. Oklahoma, October 24-29, 1971. Richmond, VA.: Spencer Printing Company, pp. 617-628.
- Holbrook, A.A., Frerichs, W.M. y Allen, P.C. (1972)** “Laboratory diagnosis of equine piroplasmiasis” in Bryans, J.T., Lexington, K. y Gerber, H. (eds.) *Equine Infectious Diseases III. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Conference on Equine Infectious Diseases*. París, July 17-21, 1972. Basel: S. Karger, pp. 467-475.
- Holman, P.J., Chieves, L. y Wagner, G.G. (1993)** “Culture confirmation of carrier status of *Babesia caballi*-infected horses”, *Journal of Clinical Microbiology*, 31(3), pp. 698-701.

- Holman, P.J., Chieves, L., Frerichs, W. M., Olson, D. y Wagner, G.G. (1994)** “*Babesia equi* erythrocytic stages continuously cultured in an enriched medium”, *The Journal of Parasitology*, 80(2), pp. 232-236.
- Holman, P.J., Becu, T., Bakos, E., Polledo, G., Cruz, D. y Wagner, G.G. (1998)** “*Babesia equi* field isolates cultured from horse blood using a microcentrifuge method”, *The Journal of Parasitology*, 84(4), pp. 696-699.
- Homer, M.J., Aguilar-Delfín, I., Telford S.R. 3rd, Krause, P.J. y Persing, D.H. (2000)** “Babesiosis”, *Clinical Microbiology Reviews*, 13(3), pp. 451-469.
- Hoogstraal, H. y Aeschlimann, A. (1982)** “Tick-host specificity”, *Bulletin de la Société Entomologique Suisse*, 55, pp. 5-32.
- Hornok, S., Mester, A., Takács, N., Fernández de Mera, I.G., de la Fuente, J. y Farkas, R. (2014)** “Re-emergence of bovine piroplasmosis in Hungary: has the etiological role of *Babesia divergens* been taken over by *B. major* and *Theileria buffeli*?”, *Parasites & Vectors*, 7: 434. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4262194/pdf/13071\\_2014\\_Article\\_1610.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4262194/pdf/13071_2014_Article_1610.pdf) (Consultado: 17 de septiembre de 2018).
- Hourrigan, J.L. y Knowles, R.C. (1979)** “Equine piroplasmosis (E.P.)”, *American Association of Equine Practitioners Newsletter*, 1, pp. 119-128.
- Huang, X., Xuan, X., Yokoyama, N., Xu, L., Zhang, S., Suzuki, N., Sugimoto, C., Nagasawa, H., Fujisaki, K. e Igarashi, I. (2003)** “High-Level expression and purification of a truncated merozoite antigen-2 *Babesia equi* in *Escherichia coli* and its potential for immunodiagnosis”, *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3), pp. 1147-1151.
- Huang, X., Xuan, X., Xu, L., Zhang, S., Yokoyama, N., Suzuki, N. e Igarashi, I. (2004)** “Development of an immunochromatographic test with recombinant EMA-2 for the rapid detection of antibodies against *Babesia equi* in horses”, *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), pp. 359-361.
- Huang, X., Xuan, X., Yokoyama, N., Katayama, Y., Anzai, T. e Igarashi, I. (2006a)** “Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens for the diagnosis of equine *Babesia* infections”, *Veterinary Parasitology*, 140(1-2), pp. 158-161.

- Huang, X., Xuan, X., Verdida, R.A., Zhang, S., Yokoyama, N., Xu, L. e Igarashi, I. (2006b)** “Immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of *Babesia caballi* and *B. equi* infections in horses”, *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(5), pp. 553-555.
- Hunfeld, K.P., Hildebrandt, A. y Gray, J.S. (2011)** “Babesiosis: recent insights into an ancient disease”, *International Journal for Parasitology*, 38(11), pp. 1219-1237.
- Hussain, M.H., Saqib, M., Raza, F., Muhammad, G., Asi, M.N., Mansoor, M.K., Saleem, M. y Jabbar, A. (2014)** “Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in five draught equine populated metropolises of Punjab, Pakistan”, *Veterinary Parasitology*, 202(3-4), pp. 248-256.

## I

- Ibrahim, A.K., Gamil, I.S., Abd-El baky, A.A., Hussein, M.M. y Tohamy, A.A. (2011)** “Comparative molecular and conventional detection methods of *Babesia equi* (*B. equi*) in Egyptian equine”, *Global Veterinaria*, 7(2), pp. 201-210.
- Ikadai, H., Xuan, X., Igarashi, I., Tanaka, S., Kanemaru, T., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Suzuki, N. y 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”, *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), pp. 2285-2290.
- Ikadai, H., Osorio, C.R., Xuan, X., Igarashi, I., Kanemaru, T., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Suzuki, N. y Mikami, T. (2000)** “Detection of *Babesia caballi* infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant 48-kDa merozoite rhoptry protein”, *International Journal for Parasitology*, 30(5), pp. 633-635.
- Ikadai, H., Martin, M.D., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Suzuki, N., Mikami, T., Kudo, N., Oyamada, T. e Igarashi, I. (2001)** “Analysis of a growth-promoting factor for *Babesia caballi* cultivation”, *The Journal of Parasitology*, 87, pp. 1484-1486.

- Ikadai, H., Nagai, A., Xuan, X., Igarashi, I., Tsugihiko, K., Tsuji, N., Oyamada, T., Suzuki, N. y Fujisaki, K. (2002)** “Seroepidemiologic studies on *Babesia caballi* and *Babesia equi* infections in Japan”, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 64(4), pp. 325-328.
- Ikadai, H., Kudo, N., Oyamada, T. e Igarashi, I. (2004)** “*Babesia caballi*: analysis of chromosomes separated by pulse field gel electrophoresis”, *The Journal of Protozoology Research.*, 14, pp. 32-36.
- Ikadao, H., Ishida, H., Sasaki, M., Taniguchi, K., Miyata, N., Koda, M., Igarashi, I. y Oyamada, T. (2006)** “Molecular cloning and partial characterization of *Babesia equi* EMA-3”, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 150(2), pp. 371-373.
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) (1987)** *Técnicas para el diagnóstico de Babesiosis y Anaplasmosis bovina*. San José: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.

## J

- Jaffer, O., Abdishakur, F., Hakimuddin, F., Riya, A., Wernery, U. y Schuster, R.K. (2010)** “A comparative study of serological tests and PCR for the diagnosis of equine piroplasmosis”, *Parasitology Research*, 106(3), pp. 709-713.
- Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P. y Malandrin, L. (2018)** “The complexity of piroplasms life cycles”, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 248. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6065256/pdf/fcimb-08-00248.pdf>  
(Consultado: 19 de noviembre de 2018).
- Javed, K., Ijaz, M., Ali, M.M., Khan, I., Mehmood, K. y Ali, S. (2014)** “Prevalence and hematology of tick borne hemoparasitic diseases in equines in and around Lahore, Pakistan”, *Journal of Zoology*, 46(2), pp. 401-408.
- Jiménez, T., García, M., Cordobés, C. y Moreira, J. (1991)** “Sistemas y diagnóstico de la babesia equina en la república de Cuba”, *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*, 22(3), pp. 161-166.
- Jongejan, F. y Uilenberg, G. (2004)** “The global importance of ticks”, *Parasitology*, 129(Suppl.1), pp. 3-14.

**Joyner, L.P., Donnelly, J. y Huck, R.A. (1981)** “Complement fixation tests for equine piroplasmosis (*Babesia equi* and *B. caballi*) performed in the UK during 1976 to 1979”, *Equine Veterinary Journal*, 13(2), pp. 103-106.

**Junta de Extremadura (2016)** *Plan estratégico y de acción para el fomento del sector equino extremeño 2017-2020*. Disponible en:  
[http://www.juntaex.es/filescms/con03/uploaded\\_files/SectoresTematicos/Ganaderia/PlanSectorEquino/PLAN ESTRATEGICO EQUINO EXTREMADURA.pdf](http://www.juntaex.es/filescms/con03/uploaded_files/SectoresTematicos/Ganaderia/PlanSectorEquino/PLAN ESTRATEGICO EQUINO EXTREMADURA.pdf)  
(Consultado: 04 de septiembre de 2018)

## K

**Kadulski, S. (1975)** “Ectoparasites of Polish artiodactylous game animals”, *Acta Parasitologica Polonica*, 23, pp. 493-535.

**Kamyngkird, K., Yangtara, S., Desquesnes, M., Cao, S., Adjou-Moumouni, P.K., Jittapalapong, S., Nimsupan, B., Terkawi, M.A., Masatani, T., Nishikawa, Y., Igarashi, I. y Xuan, X. (2014)** “Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses and mules from northern Thailand”, *The Journal of Protozoology Research*, 24, pp. 11-17.

**Kappmeyer, L.S., Perryman, L.E. y Knowles, D.P. (1993)** “A *Babesia equi* gene encodes a surface protein with homology to *Theileria* species”, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 62(1), pp. 121-124.

**Kappmeyer, L.S., Perryman, L.E., Hines, S.A., Baszler, T.V., Katz, J.B., Hennager, S.G. y 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”, *Journal of Clinical Microbiology*, 37(7), pp. 2285-2290.

**Kappmeyer, L.S., Thiagarajan, M., Herndon, D.R., Ramsay, J.D., Caler, E., Djikeng, A., Gillespie, J.J., Lau, A.O., Roalson, E.H., Silva, J.C., Silva, M.G., Suarez, C.E., Ueti, M.W., Nene, V.M., Mealey, R.H., Knowles, D.P. y Brayton, K.A. (2012)** “Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*”, *BMC Genomics*, 13, 603. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3505731/pdf/1471-2164-13-603.pdf> (consultado 14 de julio de 2018).

- Karatepe, B., Karatepe, M., Çakmak, A., Karaer, Z. y Ergün, G. (2009)** “Investigation of seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Nigde province, Turkey”, *Tropical Animal Health and Production*, 41(1), pp. 109-113.
- Katz, J., Dewald, R. y Nicholson, J. (2000)** “Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia equi*, *Babesia caballi*, *Trypanosoma equiperdum* and *Burkholderia mallei* infection in horses”, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12(1), pp. 46-50.
- Katzer, F., McKellar, S., Kirvar, E. y Shiels, B. (1998)** “Phylogenetic analysis of *Theileria* and *Babesia equi* in relation to the establishment of parasite populations within novel host species and the development of diagnostic tests”, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 95(1), pp. 33-44.
- Kerber, C.E., Ferreira, F. y Pereira, M.C. (1999)** “Control of equine piroplasmiasis in Brazil”, *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 66(2), pp. 123-127.
- Kerber, C.E., Labruna, M.B., Ferreira, F., de Waal, D.T., Knowles, D.P. y Gennari, S.M. (2009)** “Prevalence of equine Piroplasmiasis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil”, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18(4), pp. 1-8.
- Kim, C.M., Blanco, L.B., Alhassan, A., Iseki, H., Yokoyama, N., Xuan, X. e Igarashi, I. (2008)** “Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples”, *Veterinary Parasitology*, 151(2-4), pp. 158-163.
- Kizilarslan, F., Yildirim, A., Duzlu, O., Inci, A., Onder, Z. y Ciloglu, A. (2015)** “Molecular detection and characterization of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses (*Equus ferus caballus*) in Turkey”, *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(10), pp. 830-835.
- Knowles, D.P., Perryman, L.E., Goff, W.L., Miller, C.D., Harrington, R.D. y Gorham, J.R. (1991a)** “A monoclonal antibody defines a geographically conserved surface epitope of *Babesia equi* merozoite”, *Infection and Immunity*, 59(7), pp. 2314-2317.
- Knowles, D.P., Perryman, L.E., Kappmeyer, L.S. y Hennager, S.G. (1991b)** “Detection of equine antibody to *Babesia equi* merozoite protein by a monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay”, *Journal of Clinical Microbiology*, 29(9), pp. 2056-2058.

- Knowles, D.P. Jr., Kappmeyer, L.S., Stiller, D., Hennager, S.G. y Perryman, L.E. (1992)** “Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi*”, *Journal of Clinical Microbiology*, 12(30), pp. 3122-3126.
- Knowles, D.P., Kappmeyer, L.S. y Perryman, L.E. (1994)** “Specific immune responses are required to control parasitemia in *Babesia equi* infection”, *Infection and Immunity*, 62(5), pp. 1909-1913.
- Knowles, D. (1996)** “Equine babesiosis (Piroplasmosis): a problem in the international movement of horses”, *The British Veterinary Journal*, 152, pp. 123-126.
- Knowles, D.P., Kappmeyer, L.S. y Perryman, L.E. (1997)** “Genetic and biochemical analysis of erythrocyte-stage surface antigens belonging to a family of highly conserved proteins of *Babesia equi* and *Theileria* species”, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 90(1), pp. 69-79.
- Kouam, M.K., Kantzoura, V., Gajadhar, A.A., Theis, J.H., Papadopoulos, E y Theodoropoulos, G. (2010a)** “Seroprevalence of equine piroplasms and host-related factors associated with infection in Greece”, *Veterinary Parasitology*, 169(3-4), pp. 273-278.
- Kouam, M.K., Kantzoura, V., Masuoka, P.M., Gajadhar, A.A. y Theodoropoulos, G. (2010b)** “Genetic diversity of equine piroplasms in Greece with a note on speciation within *Theileria* genotypes (*T. equi* and *T. equi*-like)”, *Infection Genetics and Evolution*, 10(7), pp. 963-968.
- Krause, P.J. (2003)** “Babesiosis diagnosis and treatment”, *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 3(1), pp. 45-51.
- Kumar, S., Malhotra, D.V. y Dhar, S. (1997)** “Serodiagnosis of *Babesia equi* infection- a comparison of Dot-ELISA, complement fixation test and capillary tube agglutination test”, *Veterinary Parasitology*, 69(3-4), pp. 171-176.
- Kumar, S., Malhotra, D.V., Dhar, S. y Nichani, A.K. (2002)** “Vaccination of donkeys against *Babesia equi* using killed merozoite immunogen”, *Veterinary Parasitology*, 106(1), pp. 19-33.
- Kumar, S., Kumar, Y., Malhotra, D.V., Dhar, S. y Nichani, A.K. (2003)** “Standardization and comparison of serial dilution and single dilution enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using different antigenic preparations of the *Babesia (Theileria) equi* parasite”, *Veterinary Research*, 34(1), pp. 71-83.

- Kumar, S., Yokoyama, N., Kim, J.Y., Huang, X., Inoue, N., Xuan, X., Igarashi, I. y Sugimoto, C. (2004)** “Expression of *Babesia equi* EMA-1 and EMA-2 during merozoite developmental stages in erythrocyte and their interaction with erythrocytic membrane skeleton”, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 133(2), pp. 221-227.
- Kumar, S., Yokoyama, N., Kim, J.Y., Bork-Mimm, S., Inoue, N., Xuan, X., Igarashi, I. y Sugimoto, C. (2012)** “*Theileria equi* merozoite antigen-2 interacts with actin molecule of equine erythrocyte during their asexual development”, *Experimental Parasitology*, 132(4), pp. 508-512.
- Kumar, S., Kumar, R., Gupta, A.K., Yadav, S.C., Goyal, S.K., Khurana, S.K. y Singh, R.K. (2013)** “Development of EMA-2 recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for seroprevalence studies of *Theileria equi* infection in Indian equine population”, *Veterinary Parasitology*, 198(1-2), pp. 10-17.
- Kurt, C. y Yaman, M. (2012)** “The investigation of the prevalence of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horses by microscopic and serologic (cELISA) methods in Adana province”, *Yüzüncü yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23(1), pp. 1-4.
- Kuttler, K., Gipson, C., Goff, W. y Johnson, L. (1986)** “Experimental *Babesia equi* infection in mature horses”, *American Journal of Veterinary Research*, 47(8), pp. 1668-1670.
- Kuttler, K.L., Goff, W.L., Gipson, C.A. y Blackburn, B.O. (1988a)** “Serologic response of *Babesia equi*-infected horses as measured by complement-fixation and indirect fluorescent antibody tests”, *Veterinary Parasitology*, 26(3-4), pp. 199-205.
- Kuttler, K.L. (1988b)** “World-Wide impact of Babesiosis” in *Babesiosis of domestic animals and man*. Boca Ratón, FL: CRC Press, Inc., pp. 1-22.

## L

- Laemmli, U.K. (1970)** “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature*, 227(5259), pp. 680-685.
- Laha, R., Das, M. y Sen, A. (2015)** “Morphology, epidemiology and phylogeny of *Babesia*: an overview”, *Tropical Parasitology*, 5(2), pp. 94-100.

- LaMorte, W.W. (2016)** *The role of probability*. Disponible en:  
[http://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/MPH-Modules/BS/BS704\\_Probability/BS704\\_Probability4.html](http://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/MPH-Modules/BS/BS704_Probability/BS704_Probability4.html) (Consultado: 16 de noviembre de 2018).
- Landis, J.R. y Koch, G.G. (1977)** “The measurement of observer agreement for categorical data”, *Biometrics*, 33(1), pp. 159-174.
- Laus, F., Veronesi, F., Passamonti, F., Paggi, E., Cerquetella, M., Hyatt, D., Tesei, B. y Fioretti, D.P. (2013)** “Prevalence of tick-borne pathogens in horses from Italy”, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 75(6), pp. 715-720.
- Leal, D.C., Madruga, C.R., de Matos, P.F., Souza, B.M. y Franke, C.R. (2011)** “Evaluation of PCR and multiplex PCR in relation to nested PCR for diagnosing *Theileria equi*”, *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 31(7), pp. 575-578.
- Leblond, A., Pradier, S., Pitel, P.H., Fortier, G., Boireau, P., Chadoeuf, J. y Sabatier, P. (2005)** “An epidemiological survey of equine anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum*) in southern France”, *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 24(3), pp. 899-908.
- Levine, N.D. (1985)** *Veterinary protozoology*. Ames, IA: Iowa State University Press.
- Levine, N.D. (1988)** *The protozoan Phylum Apicomplexa*. Vol. II. Boca Ratón, FL: CRC Press, Inc.
- Lewis, B.D., Penzhorn, B.L. y Volkmann, D.H. (1999)** “Could treatment of pregnant mares prevent abortions due to equine piroplasmosis?”, *Journal of the South African Veterinary Association*, 70(2), pp. 90-91.
- Lobanov, V.A., Peckle, M., Massard, C.L., Scandrett, W.B. y Gajadhar, A.A. (2018)** “Development and validation of a duplex real-time PCR assay for the diagnosis of equine piroplasmosis”, *Parasites & Vectors*, 11(1), 125. Disponible en:  
<https://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC5834856&blobtype=pdf> (Consultado: 04 de noviembre de 2018).
- Lueso, M.J. (2018)** *El sector equino en cifras. Retos del sector equino en España*. Disponible en:  
[https://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/1cifrassectorfinal\\_tcm30-448030.pdf](https://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/1cifrassectorfinal_tcm30-448030.pdf) (Consultado: 27 de agosto de 2018).

## M

- Mackay, I.M. (2004)** “Real-Time PCR in the microbiology laboratory”, *Clinical Microbiology and Infection*, 10(3), pp. 190-212.
- Madden, P.A. y Holbrook, A.A. (1968)** “Equine piroplasmosis: indirect fluorescent antibody test for *Babesia caballi*”, *American Journal of Veterinary Research*, 29(1), pp. 117-123.
- Mahdy, O.A., Nassar, A.M., Mohamed, B.S. y Mahmoud, M.S. (2016)** “Comparative diagnosis utilizing molecular and serological techniques of *Theileria equi* infection in distinct equine populations in Egypt”, *International Journal of ChemTech Research*, 9(6), pp. 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. y Suarez, C.E. (2016)** “Assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in equine populations in Egypt by molecular, serological and haematological approaches”, *Parasites & Vectors*, 9(1), 260. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4857240/pdf/13071\\_2016\\_Article\\_1539.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4857240/pdf/13071_2016_Article_1539.pdf) (Consultado: 03 de septiembre de 2018).
- Mahoney, D.F., Wright, I.G., Frerichs, W.M., Groenendyk, S., O’Sullivan, B.M., Roberts, M.C. y Waddell, A.H. (1977)** “The identification of *Babesia equi* in Australia”, *Australian Veterinary Journal*, 53(10), pp. 461-464.
- Malekifard, F., Tavassoli, M., Yakhchali, M. y Darvishzadeh, R. (2014)** “Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* using microscopic and molecular methods in horses in suburb of Urmia, Iran”, *Veterinary Research Forum*, 5(2), pp. 129-133.
- Manna, G., Cersini, A., Nardini, R., Bartolomé del Pino, L.E., Antognetti, V., Zini, M., Conti, R., Lorenzetti, R., Veneziano, V., Autorino, G.L. y 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 and Tick-borne Diseases*, 9(5), pp. 1212-1220.
- Mans, B.J., Pienaar, R. y Latif, A.A. (2015)** “A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology”, *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(1), pp. 104-118.

- Massaro, W., Palmer, G.H., Kappmeyer, L.S., Scoles, G.A. y Knowles, D.T. (2003)** “Expression of equi merozoite antigen 2 during development of *Babesia equi* in the midgut and salivary gland of the vector tick *Boophilus microplus*”, *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), pp. 5803-5809.
- Matjila, P.T., Leisewitz, A.L., Oosthuizen, M.C., Jongejan, F. y Penzhorn, B.L. (2008)** “Detection of *Theileria* species in dogs in South Africa”, *Veterinary Parasitology*, 157(1-2), pp. 34-40.
- Maurer, F.D. (1962)** “Equine piroplasmiasis-another emerging disease”, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 141, pp. 699-702.
- McGuire, T.C., van Hoosier, G.L. Jr. y Henson, J.B. (1971)** “The complement-fixation reaction in equine infectious anemia: demonstration of inhibition by IgG (T)”, *The journal of Immunology*, 107(6), pp. 1738-1744.
- Medina, C.F. (2009)** *La técnica de hibridación reversa en línea para el diagnóstico de Babesia y Theileria en medicina veterinaria. Revisión narrativa*. Proyecto trabajo de grado. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales de Colombia.
- Mehlhorn, H., Schein, E. y Voigt, W.P. (1984)** “Light and electron microscopic study on developmental stages of *Babesia canis* within the gut of the tick *Dermacentor reticulatus*”, *The Journal of Parasitology*, 66(2), pp. 220-228.
- Mehlhorn, H. y Schein, E. (1984)** “The piroplasms: life cycle and sexual stages” in Baker, J.R., Muller, R. (eds.) *Advances in parasitology*. London: Academic Press Inc., pp. 38-105.
- Mehlhorn, H. y Schein, E. (1998)** “Redescription of *Babesia equi* (Laveran, 1901) as *Theileria equi* (Mehlhorn, Schein 1998)”, *Parasitology Research*, 84(6), pp. 467-475.
- Méndez-Álvarez, S. y Pérez-Rotha, E. (2004)** “La PCR múltiple en microbiología clínica”, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(3), pp. 183-192.
- Merkle, F.J. (1983)** *Untersuchungen über die Brauchbarkeit von KBR, IFAT und ELISA zum Nachweis der Babesia caballi-Infektion des Pferdes*. Dissertation MS. Thesis. University of Munich.
- Millar, S.A., Dykes, D.D. y Polesky, H.F. (1988)** “A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells”, *Nucleic Acids Research*, 16(3), pp. 1215.

- Moltmann, U.G., Mehlhorn, H., Schein, E., Voight, W.P. y Friedhoff, K.T. (1983)** “Ultrastructural study in the development of *Babesia equi* (Coccidia: Piroplasmia) in the salivary glands of its vector ticks”, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 30(2), pp. 218-225.
- Montes, M.G. (2006)** *Estudio comparativo entre las técnicas de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) e inmunoenzimática (cELISA) en el diagnóstico de la Piroplasmosis Equina. Aportaciones a la seroepidemiología en Extremadura y Andalucía.* Trabajo Diploma de Estudios Avanzados (D.E.A.). Universidad de Extremadura.
- Montes, G., González, R., Moreno, A.M., Vega, F.G. y Habela, M. (2007)** “Estudio preliminar sobre las ixodidosis equinas en España” en CD de resúmenes del *X Congreso Ibérico de Parasitología*. Madrid, 15-20 de julio de 2007. Madrid: Servicio de publicaciones Universidad Complutense de Madrid, p. 117.
- Montes, M.G., Fernández-García, J.L. y Habela, M.A. (2017a)** “Genetic variation of the  $\beta$ -tubulin gene of *Babesia caballi* strains”, *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 11(3), pp. 344-353.
- Montes, M.G., Fernández-García, J.L. y Habela, M.A. (2017b)** “Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Spain”, *Parasite*, 24, 14. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5432961/pdf/parasite-24-14.pdf>  
(Consultado: 26 de octubre de 2018).
- Monzón, C.M., Hoyos, C.B. y Jara, G.A. (1995)** “Brotos de tripanosomiasis equina causada por *Trypanosoma evansi* en Formosa, Argentina”, *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 14(3), pp. 747-752.
- Moreno, B. (2003)** *Higiene e inspección de carnes-II*. Madrid: Díaz de Santos, S.A.
- Moreno, J.A. (1995)** *Las garrapatas (Acari: Ixodidae) de los rumiantes del País Vasco: especies, preferencias ecológicas, dinámica estacional y prevalencia de Babesia spp. y Borrelia burgdorferi sensu lato*. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Moretti, A., Mangili, V., Salvatori, R., Maresca, C., Scoccia, E., Torina, A., Moretta, I., Gabrielli, S., Tampieri, M.P. y Pietrobelli, M. (2010)** “Prevalence and diagnosis of *Babesia* and *Theileria* infections in horses in Italy: a preliminary study”, *The Veterinary Journal*, 184(3), pp. 346-350.

- Motloang, M.Y., Thekiso, O.M., Alhassan, A., Bakheit, M., Motheo, M.P., Masangane, F.E., Thibedi, M.L., Ionue, N., Igarashi, I., Sugimoto, C. y Mbat, 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”, *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 75(2), pp. 141-146.
- Muhlnickel, C.J., Jefferies, R., Morgan-Ryan, U.M. e Irwin, P.J. (2002)** “*Babesia gibsoni* infection in three dogs in Victoria”, *Australian Veterinary Journal*, 80(10), pp. 606-610.
- Mujica, F.F., Perrone, T., Forlano, M., Coronado, A., Meléndez, R.D., Barrios, N., Álvarez, R. y Granda, F. (2011)** “Serological prevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses of Lara State, Venezuela”, *Veterinary Parasitology*, 178(1-2), pp. 180-183.
- Munkhjargal, T., Sivakumar, T., Battsetseg, B., Nyamjargal, T., Aboulaila, M., Purevtseren, B., Bayarsaikhan, D., Byambaa, B., Terkawi, M.A., Yokoyama, N. e Igarashi, I. (2013)** “Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province, Mongolia”, *Infection Genetics and Evolution*, 16, pp. 178-185.
- Musoke, A.J., McKeever, D. y Nene, V. (1997)** “Subunit vaccines for the control of tick-borne diseases: implications for the future”, *Parassitologia*, 39, pp. 131-137.

## N

- Nagore, D., García-Sanmartín, J., García-Pérez, A.L., Juste, R.A. y Hurtado, A. (2004)** “Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: epidemiological survey and phylogenetic análisis”, *Veterinary Parasitology*, 123(1-2), pp. 41-54.
- Navarrete, I. y Serrano, F.J. (1999)** “Babesiosis” en *Parasitología Veterinaria*. Madrid: McGraw Hill-Interamericana, pp. 587-592.
- Nicholson, W.L., Sonenshine, D.E., Noden, B.H. y Brown, R.N. (2018)** “Ticks (Ixodida)” in Mulen, G.R., Durden, L.A. (eds.) *Medical and veterinary entomology*. 3<sup>rd</sup> ed. London: Academic Press Inc., pp. 603-672.

- Nicolaiewsky, T.B., Richter, M.F., Lunge, V.R., Cuhna, C.W., Delagostin, O., Ikuta, N., Fonseca, A.S., Silva, S.S. y Ozaki, L.S. (2001)** “Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction”, *Veterinary Parasitology*, 101(1), pp. 9-21.
- Nijhof, A.M., Pillay, V., Steyl, J., Prozesky, L., Stoltsz, W.H., Lawrence, J.A., Penzhorn, B.L. y Jongejan, F. (2005)** “Molecular characterization of *Theileria* species associated with mortality in four species of African antelopes”, *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), pp. 5907-5911.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. y Hase, T. (2000)** “Loop-mediated isothermal amplification of DNA”, *Nucleic Acids Research*, 28(12), e63. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC102748/pdf/gnd064.pdf>  
(Consultado: 12 de septiembre de 2018).
- 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. e Igarashi, I. (2018)** “Serological and molecular prevalence of equine piroplasmiasis in Western Java, Indonesia”, *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 14, pp. 1-6.

## O

- Ogunremi, O., Georgiadis, M.P., Halbert, G., Benjamin, J., Pfister, K. y Lopez-Rebollar, L. (2007)** “Validation of the indirect fluorescent antibody and the complement fixation tests for the diagnosis of *Theileria equi*”, *Veterinary Parasitology*, 148(2), pp. 102-108.
- Ogunremi, O., Halbert, G., Mainar-Jaime, R., Benjamin, J., Pfister, K., Lopez-Rebollar, L. y Georgiadis, M.P. (2008)** “Accuracy of an indirect fluorescent-antibody test and of a complement-fixation test for the diagnosis of *Babesia caballi* in field samples from horses”, *Preventive Veterinary Medicine*, 83(1), pp. 41-51.

- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2014)** “Piroplasmosis Equina” en *Manual de pruebas de diagnóstico y vacunas para los animales terrestres*. Disponible en: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/2.05.08\\_%20Piroplasmosis\\_equina.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.05.08_%20Piroplasmosis_equina.pdf) (Consultado: 04 de septiembre de 2018).
- Oladosu, L.A. y Olufemi, B.E. (1992)** “Haematology of experimental babesiosis and ehrlichiosis in steroid immunosuppressed horses”, *Zoonoses Public Health*, 39(1-10), pp. 345-352.
- Olivera, M. y García, F. (2001)** “Equine babesiosis seroprevalence in Thoroughbred racing horse farms from Aragua and Carabobo state”, *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela*, 42(1-2), pp. 3-13.
- Olmeda, A.S., Armstrong, P.M., Rosenthal, B.M., Valladares, B., del Castillo, A., de Armas, F., Miguelez, M., González, A., Rodríguez, J.A., Spielman, A. y Telford S.R. 3rd (1997)** “A subtropical case of human babesiosis”, *Acta Tropica*, 67(3), pp. 229-234.
- Olmeda, A.S., Habela, M., Díez, E., Casado-Nostal, M.A. y Pato, N.F. (2004)** “Vectorial capacity of *Rhipicephalus bursa* in the transmission of *Theileria equi*” in Mas-Coma, S. (ed.) *Multidisciplinary for parasites, vectors and parasitic diseases: proceedings of the IX European Multicolloquium of Parasitology, Valencia (Spain), July 18-23, 2004*. Valencia, July 18-23, 2004. Bologna: Medimond, p. 809.
- Olmeda, A.S., Valcárcel, F., Camacho, A.T., Díez, E. y Meana, A. (2005)** “Theileriosis equina”, *Revista Equinus*, 13, pp. 41-49.
- Olsen, R., Steven, K., Olsen C.G. y Velázquez, A. (1983)** *Inmunología e inmunopatología de animales domésticos*. México D.F.: El manual Moderno.
- Oncel, T., Vural, G., Gicic, Y. y Arslan, M.O. (2007)** “Detection of *Babesia (Theileria) equi* (Laveran, 1901) in horses in the Kars province of Turkey”, *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 31(3), pp. 170-172.
- Oosthuizen, M.C., Zwegarth, E., Collins, N.E., Troskie, M. y Penzhorn, B.L. (2008)** “Identification of novel *Babesia* sp. from a sable antelope (*Hippotragus niger* Harris, 1838)”, *Journal of Clinical Microbiology*, 46(7), pp. 2247-2251.

- OpenCourseWare (OCW) (2018)** *Unidad 7: Apicomplexa*. Disponible en: <http://ocw.usal.es/ciencias-biosanitarias/introduccion-a-la-protozoologia-clinica-ii-filos-apicomplexa-y-microsporidia/contenidos/Unidad%203%20Apicomplexa.pdf> (Consultado: 15 de septiembre de 2018).
- Orellano, E.G. (2018)** *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*. Disponible en: [https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/162133/mod\\_resource/content/1/PCR%20I.pdf](https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/162133/mod_resource/content/1/PCR%20I.pdf) (Consultado: 15 de septiembre de 2018).
- Ouhelli, H. (1985)** *Theileriose bovine à Theileria annulata (Dschunkowsky and Luhs, 1904): recherche sur la biologie des vecteurs (Hyalomma spp.) et sur les interactions hôte-parasite*. These de Doctorate de Sciences. Institut Polytechnique de Toulouse.
- Oura, C.A., Bishop, R.P., Wampande, E.M., Lubega, G.W. y Tait, A. (2004)** “Application of a reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda”, *International Journal for Parasitology*, 34(5), pp. 603-613.

## P

- Peckle, M., Pires, M.S., dos Santos, T.M., Roier, E.C., da Silva, C.B., Vilela, J.A., Santos, H.A. y 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”, *Parasitology Research*, 112(5), pp. 2017-2025.
- Penzhorn, B., Kjemtrup, A., López-Rebollar, L. y Conrad, P.A. (2001)** “*Babesia leo* n. sp. from lions in the Kruger National Park, South Africa, and its relation to other small piroplasms”, *The Journal of Parasitology*, 87(3), pp. 681-685.
- Pérez de Castro, A.M. (2011)** *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf> (Consultado: 12 de diciembre de 2018).
- Phipps, L.P. y Otter, A. (2004)** “Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom”, *Veterinary Record*, 154(13), pp. 406-408.

- Pitel, P.H., Pronost, S., Scrive, T., Léon, A., Richard, E. y Fortier, G. (2010)** “Molecular detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in the bone marrow of asymptomatic horses”, *Veterinary Parasitology*, 170(1-2), pp. 182-184.
- Polzin, T. y Daneschmand, S.V. (2003)** “On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs”, *Operations Research Letters*, 31, pp. 12-20.
- Posada, D. y Crandall, K.A. (2001)** “Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks”, *Trends in Ecology & Evolution*, 16(1), pp. 37-45.
- Posada-Guzmán, M.F., Dolz, G., Romero-Zúñiga, J.J. y Jiménez-Rocha, A.E. (2015)** “Detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in blood from equines from four indigenous communities in Costa Rica”, *Veterinary Medicine International*, 2015, 236278. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4663365/pdf/VMi2015-236278.pdf> (Consultado: 18 de septiembre de 2018).
- Posnett, E.S. y Ambrosio, R.E. (1989)** “Repetitive DNA probes for the detection of *Babesia equi*”, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 34(1), pp. 75-78.
- Posnett, E.S. y Ambrosio, R.E. (1991)** “DNA probes for the detection of *Babesia caballi*”, *Parasitology*, 102(Pt3), pp. 357-365.
- Posnett, E.S., Fehrsen, J., de Waal, D.T. y Ambrosio, R.E. (1991)** “Detection of *Babesia equi* in infected horses and carrier animals using a DNA probe”, *Veterinary Parasitology*, 39(1-2), pp. 19-32.
- Potgieter, F.T., de Waal, D.T. y Posnett, E.S. (1992)** “Transmission and diagnosis of equine babesiosis in South Africa”, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87(Suppl.3), pp. 139-142.
- Prochno, H.C., Scorsin, L.M., De Melo, F.R., Baldani, C.D., Falbo, M.K., de Aquino, L.C. y Lemos, K.R. (2014)** “Seroprevalence rates of antibodies against *Theileria equi* in team roping horses from central-western region of Paraná”, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(1), pp. 85-89.

## Q

- Qablan, M.A., Sloboda, M., Jirků, M., Oborník, M., Dwairi, S., Amr, Z.S., Hořín, P., Lukeš, J. y Modrý, S. (2012)** “Quest for the piroplasms in camels: identification of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Jordanian dromedaries by PCR”, *Veterinary Parasitology*, 186(3-4), pp. 456-460.

- Qablan, M.A., Obroník, M., Petrzeková, K.J., Sloboda, M., Shudiefat, M.F., Hořín, P., Lukeš, J. y Modrý, D. (2013)** “Infections by *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Jordanian equids: epidemiology and genetic diversity”, *Parasitology*, 140(9), pp. 1096-1103.
- Quintero-Ronderos, P., Arango, M.T., Castiblanco, J., Correa, N.E. y Montoya-Ortíz, G. (2013)** “Analysis of proteins and antibodies” in Anaya, J.M., Shoenfeld, Y., Rojas-Villarraga, A., Levy, R.A., Cervera, R. (eds.) *Autoimmunity from bench to bedside*. Bogotá: El Rosario University Press, pp. 793-812.
- Quiroz, H. (1990)** “Enfermedades causadas por hemosporidios, piroplasmas y microsporidios” en *Parasitología y enfermedades parasitarias en animales domésticos*. 4ª ed. México D.F.: Limusa, pp. 177-210.

## R

- Rampersad, J., Cesar, E., Campbell, M.D., Samlal, M. y Ammons, D. (2003)** “A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses”, *Veterinary Parasitology*, 114(2), pp. 81-87.
- Rapoport, A., Aharonson-Raz, K., Berlin, D., Tal, S., Gottlieb, Y., Klement, E. y Steinman, A. (2014)** “Molecular characterization of the *Babesia caballi rap-1* gene and epidemiological survey in horses in Israel”, *Infection Genetics and Evolution*, 23, pp. 115-120.
- Rhalem, A., Sahibi, H., Lasri, S., Johnson, W.C., Kappmeyer, L.S., Hamidouch, A., Knowles, D.P. y Goff, W.L. (2001)** “Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosing *Babesia equi* infections of Moroccan origin and its use in determining the seroprevalence of *B. equi* in Morocco”, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13, pp. 249-251.
- Ribeiro, A.J., Cardoso, L., Maia, J.M., Coutinho, T. y Cotovio, M. (2013a)** “Prevalence of *Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Anaplasma phagocytophilum* in horses from the north of Portugal”, *Parasitology Research*, 112(7), pp. 2611-2617.
- Ribeiro, A.J., Cardoso, L., Maia, J.M., Coutinho, T. y Cotovio, M. (2013b)** “Detection of *Theileria equi* in spleen and blood of asymptomatic piroplasmas carrier horses”, *Acta Parasitologica*, 58(2), pp. 218-222.

- Ristic, M., Oppermann, J., Sibinovic, S. y Phillips, T.N. (1964)** “Equine Piroplasmosis—a mixed strain of *Piroplasma caballi* and *Piroplasma equi* isolated in Florida and studied by the fluorescent-antibody technique”, *American Journal of Veterinary Research*, 25, pp. 15-23.
- Ristic, M. y Sibinovic, S. (1964)** “Equine babesiosis. Diagnosis by precipitation in gel and by a one-step fluorescent antibody-inhibition test”, *American Journal of Veterinary Research*, 25, pp. 1519-1526.
- Robert, E.D., Morehouse, L.G., Gainer, J.H. y McDaniel, H.A. (1962)** “Equine piroplasmosis”, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 141, pp. 1323-1329.
- Rodríguez, I.P. y Barrera, H.A. (2004)** “La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención”, *Ciencia UANL*, 7(3), pp. 323-335.
- Rodríguez-Bautista, J.L., Ikadai, H., You, M., Battsetseg, B., Igarashi, I., Nagasawa, H. y Fujisaki, K. (2001)** “Molecular evidence of *Babesia caballi* (Nuttall and Strickland, 1910) parasite transmission from experimentally-infected SCID mice to the ixodid tick, *Haemaphysalis longicornis* (Neuman, 1901)”, *Veterinary Parasitology*, 102(3), pp. 185-191.
- Romero, J. y García, P. (1981)** “Babesiosis”, *Revista Ibérica de Parasitología*, 41(4), pp. 599-600.
- Rosales, C. (1989)** “Seroepidemiología e inmunidad en hatos” en *Inmunología Veterinaria*. México D.F.: Diana, pp. 327-333.
- Rosales, R., Rangel-Rivas, A., Escalona, A., Jordán, L.S., Gonzatti, M.I., Aso, P.M., Perrone, T., Silva-Iturriza, A. y Mijares, A. (2013)** “Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Venezuelan horses using Competitive-Inhibition ELISA and PCR”, *Veterinary Parasitology*, 196(1-2), pp. 37-43.
- Ros-García, A., M'ghirbi, Y., Hurtado, A. y Bouattour, A. (2013)** “Prevalence and genetic diversity of piroplasms species in horses and ticks from Tunisia”, *Infection Genetics and Evolution*, 17, pp. 33-37.
- Rothschild, C.M. y Knowles, D.P. (2007)** “Equine Piroplasmosis” in Sellon, D.C., Long, M.T. (eds.) *Equine Infectious Diseases*. St. Louis, MO: Saunders Elsevier, pp. 465-473.
- Rothschild, C.M. (2013)** “Equine Piroplasmosis”, *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(7), pp. 497-508.

- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. y Rozas, R. (2003)** “DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods”, *Bioinformatics*, 19(18), pp. 2496-2497.
- Rubel, F., Brugger, K., Pfeffer, Chitimia-Dobler, L., Didyk, Y.M., Leverenz, S., Dautel, H. y Kahl, O. (2016)** “Geographical distribution of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* in Europe”, *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7(1), pp. 224-233.
- Rüegg, S.R., Torgerson, P.R., Doherr, M., Desplazes, P., Böse, R., Robert, N. y Walzer, C. (2006)** “Equine Piroplasmosis at the reintroduction site of the Przewalski’s horse (*Equus ferus przewalskii*) in Mongolia”, *Journal of Wildlife Diseases*, 42(3), pp. 518-526.
- Rüegg, S.R., Torgerson, P.R., Desplazes, P. y 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(Pt7), pp. 939-947.
- Rüegg, S.R., Heinzmann, D., Barbour, A.D. y Torgerson, P.R. (2008)** “Estimating the transmission dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses”, *Parasitology*, 135(5), pp. 555-565.
- Ruggiero, M.A., Gordon, D.P., Orrell, T.M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R.C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M.D. y Kirk, P.M. (2015)** “A higher-level classification of all living organisms”, *PloS One*, 10(4), e0119248. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4418965/pdf/pone.0119248.pdf> (Consultado: 22 de noviembre de 2018).

## S

- Sahagun-Ruiz, A., Waghela, S.D., Holman, P.J., Chieves, L.P. y Wagner, G.G. (1997)** “Biotin-labeled DNA probe in a PCR-based assay increases detection sensitivity for the equine hemoparasite *Babesia caballi*”, *Veterinary Parasitology*, 73(1-2), pp. 53-63.

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. (1988)** “Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase”, *Science*, 239(4839), pp. 487-491.
- Salim, B.O., Hassan, S.M., Bakheit, M.A., Alhassan, A., Igarashi, I. y Karanis, P. (2008)** “Diagnosis of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Sudan using ELISA and PCR”, *Parasitology Research*, 103(5), pp. 1145-1150.
- Salim, B.O., Bakheit, M.A., Kamau, J., Nakamura, I. y Sugimoto, C. (2010)** “Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene within *Theileria equi* from horses in Sudan”, *Parasitology Research*, 106(2), pp. 493-498.
- Salim, B.O., Bakheit, M.A., Kamau, J. y Sugimoto, C. (2013)** “Current status of equine piroplasmiasis in the Sudan”, *Infection Genetics and Evolution*, 16, pp. 191-199.
- Samuel, T., Böse, R. y Schelp, C. (1999)** “Purification of a 28kDa *Babesia (Theileria) equi* antigen and a 29kDa spurious erythrocyte antigen from *in vitro* culture through ion exchange chromatography”, *Veterinary Parasitology*, 86(1), pp. 62-70.
- Sam-Yellowe, T. Y. (1996)** “Rhoptry organelles of the apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival”, *Parasitology Today*, 12(8), pp. 308-316.
- Santos, T.M., Santos, H.A. y Massard, C.L. (2008)** “Diagnostico molecular de babesiose congênita em potros neonatos no estado do Rio de Janeiro, Brasil”, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(Suppl.1), pp. 348-350.
- Schein, E., Rehbein, G., Voigt, W.P. y Zweggarth, E. (1981)** “*Babesia equi* (Laveran, 1901). 1. Development in horses and in lymphocytes culture”, *Tropenmedizin und Parasitologie*, 32(4), pp. 223-227.
- Schein, E. (1988)** “Equine Babesiosis” in Ristic, M. (ed.) *Babesiosis of domestic animals and man*. Boca Ratón, FL: CRC Press, Inc., pp. 197-208.
- Schuster, F.L. (2002)** “Cultivation of *Babesia* and *Babesia*-like blood parasites: agents of an emerging zoonotic disease”, *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), pp. 365-373.
- Schwint, O.N., Knowles, D.P., Ueti, M.W., Kappmeyer, L.S. y Scoles, G.A. (2008)** “Transmission of *Babesia caballi* by *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) is restricted to one generation in the absence of alimentary reinfection on a susceptible equine host”, *Journal of Medical Entomology*, 45(6), pp. 1152-1155.

- Schwint, O.N., Ueti, M.W., Palmer, G.H., Kappmeyer, L.S., Hines, M.T., Cordes, R.T., Knowles, D.P. y Scoles, G.A. (2009)** “Imidocarb dipropionate clears persistent *Babesia caballi* infection with elimination of transmission potential”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10), pp. 4327-4332.
- Scoles, G.A. y Ueti, M.W. (2015)** “Vector Ecology of Equine Piroplasmosis”, *Annual Review of Entomology*, 60, pp. 561-580.
- Seo, M.G., Yun, S.H., Choi, S.K., Cho, G.J., Park, Y.S., Kwon, O.D., Cho, K.H., Kim, T.H., Jeong, K.S., Park, S.J., Kwon, Y.S. y Kwak, D. (2011)** “Seroprevalence of equine piroplasms in the Republic of Korea”, *Veterinary Parasitology*, 179(1-3), pp. 224-226.
- Seo, MG., Yun, S.H., Choi, S.K., Cho, G.J., Park, Y.S., Cho, K.H., Kwon, O.D. y Kwak, D. (2013)** “Molecular and phylogenetic analysis of equine piroplasms in the Republic of Korea”, *Research in Veterinary Science*, 94(3), pp. 579-583.
- Sevilla, R. (2005)** *Epidemiología de la piroplasmosis equina en el caballo de pura raza española de Extremadura*. Trabajo de grado. Universidad de Extremadura.
- Sevinc, F., Maden, M., Kumas, C., Sevinc, M. y Ekici, O.D. (2008)** “A comparative study on the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horse sub-populations in Turkey”, *Veterinary Parasitology*, 156(3-4), pp. 173-177.
- Sgorbini, M., Bonelli, F., Nardoni, S., Rocchigiani, G., Corazza, M. y Mancianti, F. (2015)** “Seroprevalence and molecular analysis of *Babesia caballi* and *Theileria equi* from Central Italy during a 10-year period”, *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(10), pp. 865-868.
- Shkap, V., Cohen, I., Leibovitz, B., Savitsky, Pipano, E., Avni, G., Shofer, S., Giger, U., Kappmeyer, L. y Knowles, D. (1998)** “Seroprevalence of *Babesia equi* among horses in Israel using competitive inhibition ELISA and IFA assays”, *Veterinary Parasitology*, 76(4), pp. 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. y Traub-Dargatz, J.L. (2012)** “Outbreak of equine piroplasmosis in Florida”, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 240(5), pp. 588-595.
- Sigg, L., Gerber, V., Gottstein, B., Doherr, M.G. y Frey, C.F. (2010)** “Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in the Swiss horse population”, *Parasitology International*, 59(3), pp. 313-317.

- Sivakumar, T., Hayashida, K., Sugimoto, C. y Yokoyama, N. (2014)** “Evolution and genetic diversity of *Theileria*”, *Infection Genetics and Evolution*, 27, pp. 250-263.
- Slivinska, K., Víchová, B., Werszko, J., Szewczyk, T., Wróblewski, Z., Pet'ko, B., Ragač, O., Demeshkant, V. y Karbowski, G. (2016)** “Molecular surveillance of *Theileria equi* and *Anaplasma phagocytophilum* infections in horses from Ukraine, Poland and Slovakia”, *Veterinary Parasitology*, 215, pp. 35-37.
- Sloboda, M., Jirků, M., Lukešová, D., Qablan, M., Batsukh, Z., Fiala, I., Hořín, P., Modrý, M. y Lukeš, J. (2011)** “A survey for piroplasmids in horses and Bactrian camels in North-Eastern Mongolia”, *Veterinary Parasitology*, 179(1-3), pp. 246-249.
- Souza, AP., Sartor, A.A., Bellato, V. y Silva, A.B. (2000)** “Prevalência de anticorpos anti-*Babesia equi* em eqüinos no Planalto Catarinense”, *Ciência Rural*, 30(1), pp. 119-121.
- Soulé, C., Perret, C. y Dorchies, P. (1984)** “Babésiose équine à *Babesia equi*: comparaison des techniques de fixation du complément, d'immunofluorescence indirecte et d'ELISA”, *Revue de Médecine Veterinaire*, 135, pp. 419-424.
- Soulé, C. (1997)** “Le babesiosi equine”, *Summa*, 3, pp. 63-67.
- Soulsby, E. (1987)** *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7ª ed. México D.F.: Nueva Editorial Interamericana.
- Sparagano, O. y Jongejan, F. (1999)** “Molecular characterization of ticks and tick-borne pathogens”, *Parassitologia*, 41(Suppl.1), pp. 101-105.
- Steinman, A., Zimmerman, T., Klement, E., Lensky, I.M., Berlin, D., Gottlieb, Y. y Baneth, G. (2012)** “Demographic and environmental risk factors for infection by *Theileria equi* in 590 horses in Israel”, *Veterinary Parasitology*, 187(3-4), pp. 558-562.
- Stepanova N.J. y Petrovskii, V.V. (1975)** “Serological diagnosis of *Nuttalia (Babesia) equi* infection in horses (complement fixation test)”, *Veterinariya*, 1, pp. 56-58.
- Suarez, C.E., Palmer, G.H., Florin-Christensen, M., Hines, S.A., Hötzel, I. y McElwain, T.F. (2003)** “Organization, transcription and expression of rhoptry associated protein genes in the *Babesia bigemina rap-1* locus”, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 127(2), pp. 101-112.

- Sugimoto, C., Sudo, T., Hanafusa, Y., Iwasaki, T., Onuma, M., Kanemaru, T. y Kamada, M. (1997)** “Molecular characterization of a 30Kda *Babesia equi* merozoite surface protein”, *Tropical Animal Health and Production*, 29(Suppl.4), p. 62.
- Sugimoto, C., Kawase, Y., Sako, Y., Kakuda, T., Zweigarth, E., Kanemaru, T., Wada, R. y Onuma, M. (1998)** “Molecular cloning of *Babesia caballi* antigen genes and ELISA development”, *Parasitology International*, 47(Suppl.1), p. 234.
- Sumbria, D. y Singla, L.D. (2015)** “Recent diagnostic and control approaches in equine piroplasmiasis”, *Veterinaria*, 2(1), pp. 29-32.
- Sumbria, D., Singla, L.D., Kumar, S., Sharma, A., Dahiya, R.K. y Setia, R. (2016a)** “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 Tropica*, 155, pp. 104-112.
- Sumbria, D., Singla, L.D., Kumar, S. y Sharma, A. (2016b)** “*Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in equids in Punjab, India: a serological and molecular survey”, *Tropical Animal Health and Production*, 48(1), pp. 45-52.

## T

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S. (2007)** “MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0”, *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), pp. 1596-1599.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. y Kumar, S. (2013)** “MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0”, *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), pp. 2725-2729.
- Tanaka, T., Xuan, X., Ikadai, H., Igarashi, I., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Mikami, T. y Suzuki, N. (1999)** “Expression of *Babesia equi* merozoite antigen-2 by recombinant baculovirus and its use in the ELISA”, *International Journal for Parasitology*, 29(11), pp. 1803-1808.
- Taylor, W.J., Bryant, J., Anderson, J.A. y Willers, K. (1969)** “Equine piroplasmiasis in the United States—a review”, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 155(1), pp. 915-919.

- Teglas, M., Matern, E., Lein, S., Foley, P., Mahan, S.M. y Foley, J. (2005)** “Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses”, *Veterinary Parasitology*, 131(1-2), pp. 119-127.
- Tenter, A.M. y Friedhoff, K.T. (1986)** “Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections”, *Veterinary Parasitology*, 20(1-3), pp. 49-61.
- Tenter, A.M., Otte, M.J., González, C.A. y Abuabara, Y. (1988)** “Prevalence of piroplasmiasis in equines in the Colombian province of Córdoba”, *Tropical Animal Health and Production*, 20(2), pp. 93-98.
- Terkawi, M.A., Alhasan, H., Huyen, N.X., Sabagh, A., Awier, K., Cao, S., Goo, Y.K., Aboge, G., Yokoyama, N., Nishikawa, Y., Kalb-Allouz, A.K., Tabbaa, D., Igarashi, I. y Xuan, X. (2012)** “Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from central region of Syria”, *Veterinary Parasitology*, 187(1-2), pp. 307-311.
- Thompson, P.H. (1969)** “Ticks as vectors of equine piroplasmiasis”, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 155, pp. 454-457.
- Thrusfield, M., Ortega, C., de Blas, I., Noordhuizen, J.P. y Frankena, K. (2001)** “Win Episcope 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine”, *Veterinary Record*, 148(18), pp. 567-572.
- Tian, Z., Luo, J., Zheng, J., Xie, J., Shen, H., Yin, H., Luo, J., Tian, M., Yuan, X., Wang, F. y Liu, G. (2013)** “Phylogenetic analysis of *Babesia* species in China based on *cytochrome b* (COB) gene”, *Infection Genetics and Evolution*, 13, pp. 36-40.
- Todorovic, R. y Carson, C. (1981)** “Methods for measuring the immunological response to *Babesia*” in Ristic, M., Kreier, J.P. (eds.) *Babesiosis*. New York, NY: Academic Press Inc., pp. 381-410.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979)** “Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications”, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 76(9), pp. 4350-4354.
- Travassos, J.A. (1994)** *As carraças (Acarina, Ixodoidea) da Península Ibérica: algumas considerações sobre a sua biogeografia e relacionamento com a ixodofauna afropaleártica e afrotrópica*. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical.

**Turk, N., Milas, Z., Habuš, J., Štritof, Z., Mojčec, V., Barbič, L., Stevanovič, V., Perharič, M. y Starešina, V. (2013)** “Equine leptospirosis in Croatia- occurrence of subclinical infections and abortions”, *Veterinarski Arhiv*, 83(3), pp. 253-262.

## U

**Ueti, M.W., Palmer, G.H., Kappmeyer, L.S., Scoles, G.A. y 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*”, *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), pp. 5803-5809.

**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. y 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(9), e44713.  
Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3435266/pdf/pone.0044713.pdf>

(Consultado: 18 de julio de 2018).

**Uilenberg, G. (1995)** “International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health”, *Veterinary Parasitology*, 57(1-3), pp. 19-41.

**Uilenberg, G. (2006)** “Babesia: a historical overview”, *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), pp. 3-10.

**Universidad de Buenos Aires (UBA) (2010)** *Guía de técnicas inmunológicas*.  
Disponible en: <http://www.fmed.uba.ar/depto/mictobiologia/gt2010.pdf> (Consulta: 07 de octubre de 2018).

**Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. y Rozen, S.G. (2012)** “Primer3-new capabilities and interfaces”, *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3424584/pdf/gks596.pdf>

(Consultado: 15 de julio de 2018).

**Urquhart, G. M., Armour, J., Duncan, J. L., Dunn, A. M. y Jennings, F. W. (1996)** *Veterinary Parasitology*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Black Well Science Ltd.

## V

- Valdez, R. (2013)** “Exploring our ancient roots: Genghis Khan to Aldo Leopold, the origins of wildlife management”, *The wildlife professional*, Summer 2013, pp. 50-53.
- Vargas, D., Bonet, R., Oliva, P. y Campano, S. (2004)** “Implementación de la técnica de PCR en la identificación de *Babesia ssp* en equinos”, *Parasitología Latinoamericana*, 59, pp. 179-182.
- Vega, S. y Domingo, R. (2012)** “Study of the serological prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Pure Spanish Breed horses in the Valencian Community”, *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 69(1-2)/2012. Disponible en: [Journals.usamvcluj.ro/index.php/veterinary/article/view/8846](http://Journals.usamvcluj.ro/index.php/veterinary/article/view/8846) (Consultado: 12 de julio de 2018).
- Veronesi, F., Laus, F., Moretta, I., Piergili-Fioretti, D., Apaterna, A., Tesei, B. y Moretti, A. (2010)** “Prevalenza di *Babesia caballi* e *Theileria equi* in cavalli di razza tolfetana”, *Ippologia*, 2, pp. 23-29.
- 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. y Vidotto, O. (2013)** “Seroepidemiological survey of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from a rural and from urban areas of Paraná State, southern Brazil”, *Ticks and Tick-borne Diseases*, 4(6), pp. 537-541.
- Vieira, T.S., Valente, J.D., Silva, N.B., Sicupira, P.M., Barros-Folho, I.L., Biondo, A.W., Vieira, R.F. y Vidotto, O. (2015)** “Comparative study of two serological test for detection of anti-*Theileria equi* antibodies in horses”, *Semina: Ciências Agrarias*, 36(6), pp. 4361-4364.
- Voller, A., Bidwell, D. y Bartlett, A. (1980)** “Enzyme linked immunosorbent assay” in Rose, N.R., Friedman, H. (eds.) *Manual of clinical immunology*. Washington D.C.: American society of microbiology, pp. 359-371.
- Votýpka, J. (2011)** *Piroplasmorida Wenyon 1926: The Tree of Life Web Project*. Disponible en: <http://tolweb.org/Piroplasmorida/68060/2011.05.18> (Consultado: 15 de septiembre de 2018).

## W

- Wang, M., Guo, W., Igarashi, I., Xuan, X., Wang, X., Xiang, W. y Jia, H. (2014)** “Epidemiological investigation of equine piroplasmosis in China by enzyme-linked immunosorbent assays”, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 76(4), pp. 549-552.
- Wanger, O., Chavez, V., Huang, R.S., Wahed, A., Actor, J.K. y Dasgupta, A. (2017)** “Overview of molecular diagnostics principles” in *Microbiology and molecular diagnosis in pathology. A comprehensive review for board preparation, certification and clinical practice*. Amsterdam: Elsevier, pp. 233-257.
- Weiland, G., Aicher, B.M. y Boch, J. (1984)** “Serodiagnosis and therapy control of equine piroplasmosis by CFT and IFAT”, *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 97, pp. 341-349.
- 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)”, *Veterinary Parasitology*, 20(1-3), pp. 43-48.
- Wise, L.N., Kappmeyer, L.S., Mealey, R.H. y Knowles, D.P. (2013)** “Review of equine piroplasmosis”, *Journal of Veterinary International Medicine*, 27(6), pp. 1334-1346.

## X

- Xu, Y., Zhang, S., Huang, X., Bayin, C., Xuan, X., Igarashi, I., Fujisaki, K., Kabeya, H., Maruyama, S. y Mikami, T. (2003)** “Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Jilin province of China”, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 65(9), pp. 1015-1017.
- Xuan, X., Igarashi, I., Avarzed, A., Ikadai, H., Inoue, N., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Toyoda, Y. y Suzuki, N. (1998)** “Diagnosis of *Babesia caballi* infection in horses by polymerase chain reaction”, *Parasitology International*, 47(Suppl.1), p. 375.

- Xuan, X., Igarashi, I., Tanaka, T., Fukumoto, S., Nagasawa, H., Fujisaki, K. y Mikami, T. (2001a)** “Detection of antibodies to *Babesia equi* in horses by a latex agglutination test using recombinant *EMA-1*”, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(3), pp. 645-646.
- Xuan, X., Larsen, A., Ikadai, H., Tanaka, T., Igarashi, I., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Toyoda, Y., Suzuki, N. y Mikami, T. (2001b)** “Expression of *Babesia equi* merozoite antigen 1 in insect cells by recombinant baculovirus and evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbent assay”, *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), pp. 705-709.
- Xuan, X., Nagai, A., Battsetseg, B., Fukumoto, S., Malaka, L.H., Inoue, N., Igarashi, I., Mikami, T. y Fujisaki, K. (2001c)** “Diagnosis of equine piroplasmiasis in Brazil by serodiagnostic methods with recombinant antigens”, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 63(10), pp. 1159-1160.
- Xuan, X., Chahan, B., Huang, X., Yokohama, N., Makala, L.H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Maruyama, S., Sakai, T. y Mikami, T. (2002)** “Diagnosis of equine piroplasmiasis in Xinjiang province of China by the enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant antigens”, *Veterinary Parasitology*, 108(2), pp. 179-182.

## Y

- Ybañez, A.P., Ybañez, R.H., Talle, M.G., Arreglo, R.M., Geens, M.J., Villas, J.G. 3rd, Villar, S.R., Laruga, C.L., Cao, S., Moumouni, F.P., Liu, M., Igarashi, I. y Xuan, X. (2018)** “Serological and molecular detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Philippine horses”, *Ticks and Tick-borne Diseases*, 9(5), pp. 1125-1128.
- Yeruham, I., Hadani, A., Galker, F. y Rosen, S. (1989)** “Notes on the biology of the tick *Rhipicephalus bursa* (Canestrini and Fanzago, 1877) in Israel”, *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 42(2), pp. 233-235.
- Yin, H., Lu, W. y Luo, J. (1997)** “Babesiosis in China”, *Tropical Animal Health and Production*, 29 (Suppl.4), pp. 11-15.

**Yokoyama, N., Okamura, M. e Igarashi, I. (2006)** “Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage”, *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), pp. 22-32.

**Yousfi-Monod, R. y Aeschlimann, A. (1986)** “Recherches sur les tiques (Acarina: Ixodidae), parasites des bovidés dans l’Ouest algérien. Inventaire systématique et dynamique saisonnière”, *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 61(3), pp. 341-358.

## Z

**Zamoto, A., Tsuji, M., Wei, Q., Cho, A.H., Shin, E.H., Kim, T.S., Leonova, G.N., Hagiwara, K., Asakawa, M., Kariwa, H., Takashima, I. e Ishihara, C. (2004)** “Epizootiologic survey for *Babesia microti* among small wild mammals in northeastern Eurasia and a geographic diversity in the  $\beta$ -tubulin gene sequences”, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 66(7), pp. 785-792.

**Zanet, S., Trisciuglio, A., Bottero, E., García, I., Gortazar, C., Carpignano, M.G. y Ferroglío, E. (2014)** “Piroplasmosis in wildlife: *Babesia* and *Theileria* affecting free-ranging ungulates and carnivores in the Italian Alps”, *Parasites & Vectors*, 7, 70. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3929754/pdf/1756-3305-7-70.pdf>  
(Consultado: 12 de julio de 2018).

**Zanet, S., Bassano, M., Trisciuglio, A., Taricco, I. y Ferroglío, E. (2017)** “Horses infected by Piroplasms different from *Babesia caballi* and *Theileria equi*: species identification and risk factors analysis in Italy”, *Veterinary Parasitology*, 236, pp. 38-41.

**Zapf, F. y Schein, E. (1994)** “The development of *Babesia (Theileria) equi* (Laveran, 1901) in the gut and the haemolymph of the vector ticks, *Hyalomma* species”, *Parasitology Research*, 80(4), pp. 297-302.

**Zhang, Y., Chahan, B., Liu, S., Song, R., Li, Y., Huercha, Guo, Q., Wu, H. y Zhu, Y. (2017)** “Epidemiologic studies on *Theileria equi* infections for grazing horses in Ili of Xinjiang province”, *Veterinary Parasitology*, 244, pp. 111-113.

- Zobba, R., Ardu, M., Niccolini, S., Chessa, B., Manna, L., Cocco, R. y Pinna-Parpaglia, M.L. (2008)** “Clinical and laboratory findings in equine piroplasmosis”, *Journal of Equine Veterinary Science*, 28(5), pp. 301-308.
- Zwart, D. y Brocklesby, D.W. (1979)** “Babesiosis: non-specific resistance, immunological factors and pathogenesis”, *Advances in Parasitology*, 17, pp. 49-113.
- Zweygarth, E., Just, M.C. y de Waal, D.T. (1995)** “Continuous *in vitro* cultivation of erythrocytic stages of *Babesia equi*”, *Parasitology Research*, 81(4), pp. 355-358.
- Zweygarth, E., Just, M.C. y de Waal, D.T. (1997)** “*In vitro* cultivation of *Babesia equi*: detection of carrier animals and isolation of parasites”, *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 64(1), pp. 51-56.
- Zweygarth, E., van Niekerk, C.J. y de Waal, D.T. (1999)** “Continuous *in vitro* cultivation of *Babesia caballi* in serum-free medium”, *Parasitology Research*, 85(5), pp. 413-416.
- Zweygarth, E., Lopez-Rebollar, L.M., Nurton, J. y Guthrie, A.J. (2002)** “Culture, isolation and propagation of *Babesia caballi* from naturally infected horses”, *Parasitology Research*, 88(5), pp. 460-462.

## **10.- Anexos**

---



## Anexo I

### Secuencia del gen de la $\beta$ -tubulina de *B. caballi*

Fragmento secuenciado del gen de la  $\beta$ -tubulina de *Babesia caballi* de una muestra procedente de Málaga (España).

Número de acceso de la secuencia en GenBank: KX358867. Longitud: 761 bases

```
>LCKX358867 Babesia caballi beta-tubulin gene, partial cds, isolate:
GM Andalusian
TAGTGGTAACCAGATCGGTGCCAAGTTCTGGGAGGTCATCTCCGACGAACACGGAATTGACCCGGTAAGT
GCTTAAACCATGTAAAGTTGTGTTTTGTAAGCACTGGTATGCGTGGAGGGCAGTCTCTGTGGACGCAGTG
TTTTGGTACACATGTTAGTAGCCACACTGGGCGGTGATGTACCAATGTGCTGTGACGTATACATTGGAAC
GTGCCGTTTCATTTGCTCAGAGCGGGACGTACCACGGTGACAGCGACCTCCAGCTCGAGCGTGTGAC
GTTTTTTACAATGAGGCTACCGGTGGACGCTACGTCCCTCGCGCCATCCTCATGGACCTCGAACCCGGCA
CGATGGACTCCGTCCGGGCTGGACCATTCCGGACAACCTTTCAGACCCGACAACCTTCGTCTTCGGACAGAC
CGGAGCGGGAAAATAACTGGGCCAAGGGGCACTACACAGAGGGCGCCGAACCTTATTGACTCCGTCTTGAT
GTTGTACGCAAGGAGGCCGAAGGGTGCGACTGCCTCCAGGGCTTCCAGATCACCCACTCGCTTGGAGGTG
GCACAGGAAGTGGTATGGGAACGTTGCTGATCAGCAAAAATCCGCGAGGAATACCCCGACAGGATCATGGA
GACCTTCTCCGTGTTCCCTCGCCCAAGGTCTCCGACACCGTCGTCGAGCCCTACAACGCCACGCTGTCC
GTGCACCAGCTCGTGGAGAACGCCGACGAGGTGCAGGTCATCGACAACGAGGCGCTGTACG
```



## Anexo II

### Secuencias del gen *RAP-1* de *B. caballi*

Fragmento secuenciado del gen *RAP-1* de *Babesia caballi* de una muestra procedente de Málaga (España).

Número de acceso de la secuencia en GenBank: MH538120. Longitud: 769 bases

>LCMH538120 *Babesia caballi* isolate SPAIN01 rhoptry-associated protein 1 (*RAP-1*) gene, partial cds, isolate:

```
CATGACACCCAACGACACTTTGGGTGACGTGACAAAGAGTTTGTGGCTGCCAGCGAAAATGTGAACGCA
GTCGCCGAAGCTTCTAGAATCAACAGTGACATGAGCGCTTACTTGTCTACTGTTTCCGACAGCTTCGTTCG
AGAGCGTTTGCAGCAAAGCCCCGAAAACAGCAACTGCGTTGCTTCGGTTGGTACCTACATGAACCGCTG
CGCTAACTTGGATTGCCTGACTATCGACAATTTGAAGTACCCAGTTGAGGCTAAATACCAACCGCTGACC
CTTCCGGACCCCTACCAGTTACACGCTGCTTTTGTAGCCTTCAAGAACAGTGACGCGAACCCCTGCCAAAA
CCGTGGTAACTCGTTTCTGGATGCGTTTCAGGAGTGGCAAGAACCACAGTTATTATCACGACTTCGTTTTT
TAACCTTCTGGAGAAGAACGTGACTAGCGACCCCAACGCTACTGACATTGAGAACTTTGTGTCCAAGTAC
TTGTACATGACCACGGTTTACTACAAGACTTACACGAACGTTGACAAGTTGGGTGCTAGGTTCTTTGACA
AGTTGTCCCTTCACTACTGGTTTGTGGCTGGGGCATCAAGAAGGCGCTTAAGCGAATCATTCAATCTAA
CCTTCCAATTGACCTAGGCACATACAGCATCAGCCGCTGGAGCACATTACGAGCAGTTACAAGGATTAC
ATGGACACTCAGATTCCCTGTGATGTCCAAGTTTGCAGGAGCGTTTTTCGCGTATGGTAGTGAAGAGACTG
```

Fragmento secuenciado del gen *RAP-1* de *Babesia caballi* de una muestra procedente de Cáceres (España).

Número de acceso de la secuencia en GenBank: MH538121. Longitud: 769 bases

>LCMH538121 *Babesia caballi* isolate SPAIN02 rhoptry-associated protein 1 (*RAP-1*) gene, partial cds, isolate:

```
CATGACACCCAACGACACTTTGGGTGACGTGACAAAGAGTTTGTGGCTGCCAGCGAAAATGTGAACGCA
GTCGCCGAAGCTTCTAGAATCAACAGTGACATGAGCGCTTACTTGTCTACTGTTTCCGACAGCTTCGTTCG
AGAGCGTTTGCAGCAAAGCCCCGAAAACAGCAACTGCGTTGCTTCGGTTGGTACCTACATGAACCGCTG
CGCTAACTTGGATTGCCTGACTATCGACAATTTGAAGTACCCAGTTGAGGCTAAATACCAACCGCTGACC
CTTCCGGACCCCTACCAGTTACACGCTGCTTTTGTAGCCTTCAAGAACAGTGACGCGAACCCCTGCCAAAA
CCGTGGTAACTCGTTTCTGGATGCGTTTCAGGAGTGGCAAGAACCACAGTTATTATCACGACTTCGTTTTT
TAACCTTCTGGAGAAGAACGTGACTAGCGACCCCAACGCTACTGACATTGAGAACTTTGTGTCCAAGTAC
TTGTACATGACCACGGTTTACTACAAGACTTACACGAACGTTGACAAGTTGGGTGCTAGGTTCTTTGACA
AGTTGTCCCTTCACTACTGGTTTGTGGCTGGGGCATCAAGAAGGCGCTTAAGCGAATCATTCAATCTAA
CCTTCCAATTGACCTAGGCACATACAGCATCAGCCGCTGGAGCACATTACGAGCAGTTACAAGGATTAC
ATGGACACTCAGATTCCCTGTGATGTCCAAGTTTGCAGGAGCGTTTTTCGCGTATGGTAGTGAAGAGACTG
```

Fragmento secuenciado del gen *RAP-1* de *Babesia caballi* de una muestra procedente de Segovia (España).

Número de acceso de la secuencia en GenBank: MH538122. Longitud: 769 bases

>LCMH538122 *Babesia caballi* isolate SPAIN03 rhoptry-associated protein 1 (*RAP-1*) gene, partial cds, isolate:

```
CATGACACCCAACGACACTTTGGGTGACGTGACAAAGAGTTTGTGGCTGCCAGCGAAAATGTGAACGCA
GTCGCCGAAGCTTCTAGAATCAACAGTGACATGAGCGCTTACTTGTCTACTGTTTCCGACAGCTTCGTGC
AGAGCGTTTGCAGCAAAGCCCCGAAAACAGCAACTGCGTTGCTTCGGTTGGTACCTACATGAACCGCTG
CGCTAACTTGGATTGCCTGACTATCGACAATTTGAAGTACCCAGTTGAGGCTAAATACCAACCGCTGACC
CTTCCGGACCCCTACCAGTTACACGCTGCTTTTGTAGCCTTCAAGAACAGTGACGCGAACCCCTGCCAAA
CCGTGGTAACTCGTTTCTGGATGCGTTTCAGGAGTGGCAAGAACCACAGTTATTATCACGACTTCGTTTT
TAACCTTCTGGAGAAGAACGTGACTAGCGACCCCAACGCTACTGACATTGAGAACTTTGTGTCCAAGTAC
TTGTACATGACCACGGTTTACTACAAGACTTACACGAACGTTGACAAGTTGGGTGCTAGGTTCTTTGACA
AGTTGTCCCTTCACTACTGGTTTGTGGTGGGGCATCAAGAAGGCGCTTAAGCGAATCATTCAATCTAA
CCTTCCAATTGACCTAGGCACATACAGCATCAGCCGCCTGGAGCACATTACGAGCAGTTACAAGGATTAC
ATGGACACTCAGATTCCTGTGATGTCCAAGTTTGGCGAGCGTTTTTTCGCGTATGGTAGTGAAGAGACTG
```

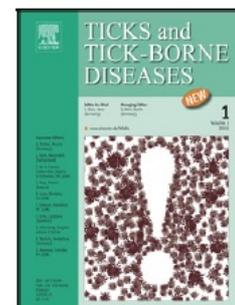
## Anexo III

### Documentación justificativa de la aceptación del estudio III en la revista *Ticks and Tick-borne Diseases*

#### Accepted Manuscript

Title: A multinested PCR for detection of the equine piroplasmids *Babesia caballi* and *Theileria equi*

Authors: M.G. Montes Cortés, J.L. Fernández-García, M.Á. Habela



PII: S1877-959X(18)30100-6  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.008>  
Reference: TTBDIS 1135

To appear in:

Received date: 5 March 2018  
Revised date: 24 October 2018  
Accepted date: 10 November 2018

Please cite this article as: Montes Cortés MG, Fernández-García JL, Habela MÁ, A multinested PCR for detection of the equine piroplasmids *Babesia caballi* and *Theileria equi*, *Ticks and Tick-borne Diseases* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.008>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



## Anexo IV Informe de los directores sobre el factor de impacto de las publicaciones y sobre los trabajos realizados en coautoría



### Informe de los Directores de Tesis

Dr. D. Miguel Ángel Habela Martínez-Estélez, como Director, y Dr. D. José Luis Fernández García, como co-Director de la Tesis que lleva por título: “Aportaciones al diagnóstico serológico y molecular de la piroplasmosis equina”, de la que es autora la Doctoranda y Licenciada en Veterinaria D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Guadalupe Montes Cortés, emitimos el siguiente Informe sobre categorización de los artículos incluidos en la citada tesis doctoral al objeto de dar obligado cumplimiento al art. 46 (apartado 2) de la normativa de la UNEX en relación al depósito de tesis doctorales por compendio de publicaciones. Este informe se elevará a la comisión académica del correspondiente programa (Programa de Doctorado en Salud Pública y Animal, R005) para su pertinente análisis.

La citada tesis incluye los siguientes estudios:

#### Estudio n° 1

- Título del trabajo: Genetic Variation of the  $\beta$ -tubulin Gene of *Babesia caballi* Strains.
- Posición del autor doctorando: Primer autor
- Revista: Journal of Arthropod-Borne Disease
- Número y fecha de publicación: sep. 11 (3): 344–353 (2017)
- Identificador DOI: No aplicado
- Índices de calidad de la revista: FI 1,231
- Categoría: Q3
- Otros medios donde se ha difundido información relevante: Secuencias sometidas y aprobadas en GenBank (NCBI, USA) con número de acceso público KX358867.

### Estudio nº 2

- Título del trabajo: Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Spain.
- Posición del autor doctorando: Primer autor
- Revista: Parasite
- Número y fecha de publicación: 24, 14 (2017)
- Identificador DOI: 10.1051/parasite/2017015
- Índices de calidad de la revista: FI 2,069
- Categoría: Q2

### Estudio nº 3

- Título del trabajo: A multinested PCR for detection of the equine piroplasmids *Babesia caballi* and *Theileria equi*
- Posición del autor doctorando: Primer autor
- Revista: Ticks and Tick-borne Diseases
- Número y fecha de publicación: Disponible en línea el 13 de noviembre de 2018.
- Identificador DOI: 10.1016 / j.ttbdis.2018.11.008
- Índices de calidad de la revista: FI 2,612
- Categoría: Q2
- Otros medios donde se ha difundido información: Secuencias sometidas y aprobadas en GenBank (NCBI, USA) con números de acceso público MH538120 a MH 538122.

En Cáceres, a 08 de enero de 2019

Fdo. Miguel Ángel Habela Martínez-Estélez  
(Director de Tesis)

Fdo. José Luis Fernández García  
(Co-Director de Tesis)





