



**Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Centro de Medicina
Deportiva Equina. Universidad de Córdoba**

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y LABORATORIAL,
INCLUYENDO PROTEÍNAS DE FASE AGUDA, EN
CABALLOS POSITIVOS A *THEILERIA EQUI***

ROCIO RODRIGUEZ GONZALEZ-MIRANDA

Directoras: Dra. Ana Muñoz Juzado

Dra. Cristina Riber Pérez

Córdoba, 2017

TITULO: **CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y LABORATORIAL, INCLUYENDO
PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EN CABALLOS POSITIVOS A
THEILERIA EQUI**

AUTOR: *Rocío Rodríguez González-Miranda*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS:

CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y LABORATORIAL, INCLUYENDO PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EN CABALLOS POSITIVOS A *THEILERIA EQUI*

DOCTORANDO/A: Rocío Rodríguez González-Miranda

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución de la tesis, así como a los trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La presente tesis doctoral ha sido realizada bajo la tutela de dos directoras pertenecientes a el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Córdoba.

Durante la realización de esta tesis, la doctoranda ha mostrado un gran interés y dedicación al trabajo. Además de llevar a cabo la tesis doctoral, y en relación a ella, ha publicado los siguientes **artículos**:

MUÑOZ A, RODRÍGUEZ RGM, RIBER C, TRIGO P, GÓMEZ-DÍEZ M, CASTEJÓN FM (2012). Subclinical *Theileria equi* infection and rhabdomyolysis in three endurance horses. Pakistan Veterinary Journal, 33(2): 256-258.

(Índice de impacto; 1,365; Posición que ocupa la revista en la categoría: 42/142; Tercil T1; Base de datos: ISI Web of Knowledge; Categoría: Veterinary Sciences. Año: 2012)

RODRÍGUEZ RGM, CERÓN JJ, RIBER C, CASTEJÓN F, GÓMEZ-DÍEZ M, SERRANO-RODRIGUEZ JM, MUÑOZ A (2014). Acute phase proteins in Andalusian horses infected with *Theileria equi*. The Veterinary Journal, 202: 182-183.

(Índice de impacto; 2,165; Posición que ocupa la revista en la categoría: 11/142; Tercil T1; Base de datos: ISI Web of Knowledge; Categoría: Veterinary Sciences. Año: 2013)

Además, la doctoranda ha presentado las siguientes comunicaciones a **congresos internacionales**:

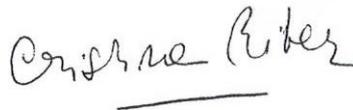
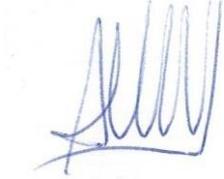
RODRÍGUEZ RGM, MUÑOZ A, RIBER C, SATUÉ K, CASTEJÓN F (2011). Clinical signs and laboratorial abnormalities in horses naturally infected by *Theileria equi*. European Society for Veterinary Clinical Pathology (ESVCP). 13th Annual Congress. Dublin, Ireland. September 1-3.

RODRÍGUEZ RGM, MUÑOZ A, RIBER C, RUBIO MD, CASTEJÓN F, CERÓN J (2012). Proteínas de fase aguda en caballos positivos a *Theileria equi*. XIII Congreso Internacional de Medicina y Cirugía equina. Sevilla, 23 y 24 de Noviembre de 2012.

GÓMEZ-DÍEZ M, MUÑOZ A, ESGUEVA M, SERRANO-CABALLERO JM, RUBIO MD, RODRÍGUEZ RGM, SERRANO-RODRIGUEZ JM (2014). La administración oral de quinalaprilo en el caballo reduce la actividad sérica de la enzima de conversión de la angiotensina más de un 70%. XV Congreso Internacional de Medicina y Cirugía equina. Sevilla, 5 y 6 de Diciembre de 2014.

Debido al rigor científico, calidad de la tesis, formación científica y labor realizada por la doctoranda, se autoriza la presentación de la presente tesis doctoral.

Córdoba, Mayo 2017



Fdo.: Ana Muñoz Juzado

Dpto. Medicina y Cirugía Animal
Centro de Medicina Deportiva Equina
Facultad de Veterinaria
Universidad de Córdoba

Fdo.: Cristina Riber Pérez

Dpto. Medicina y Cirugía Animal
Centro de Medicina Deportiva Equina
Facultad de Veterinaria
Universidad de Córdoba

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecerle a la directora de mi tesis, la profesora Dra. D^a Ana Muñoz Juzado su gran ayuda, sin ella y sin sus conocimientos y consejos no habría podido presentar esta tesis. Ha tenido un hueco siempre para mí a pesar del poco tiempo libre del que dispone. Sus consejos, sus revisiones y su esfuerzo han contribuido a sacar este trabajo adelante. Así como a la Dra. D^a Cristina Riber Pérez, por su apoyo incondicional y sus grandes consejos.

De forma especial, quiero agradecer a mis padres y mi hermana, toda la ayuda que me dan cada día, su cariño y el apoyo constante, sin ellos esta tesis no habría sido posible. Son un ejemplo de trabajo y esfuerzo, me han apoyado con mucho cariño y siempre los he tenido ahí para todo lo que he necesitado. Gracias a los tres por todo lo que me brindáis cada día, por confiar en mí y por ayudarme siempre con una sonrisa. Gracias por echarme una mano siempre, sois de verdad los mejores padres que un hijo puede tener.

Por último, quiero agradecer a todos los compañeros veterinarios, su colaboración y dedicación rellenando las encuestas, imprescindibles para este estudio, así como a los propietarios de los caballos que me han dejado tomar las muestras, y poder conseguir que este trabajo llegue felizmente a su fin.

A mis padres y mi hermana
por su gran apoyo y ayuda, y
a mis tres hijos y a mi marido,
que todos son la alegría de mi vida.

ÍNDICE

1. LISTADO DE TABLAS	Pág. 19
2. LISTADO DE FIGURAS Y FOTOGRAFÍAS	Pág. 25
3. LISTADO DE ABREVIATURAS	Pág. 29
4. INTRODUCCIÓN GENERAL	Pág. 35
5. OBJETIVOS GENERALES E HIPÓTESIS	Pág. 39
6. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	Pág. 43
6.1. Descripción del parásito: <i>Babesia equi</i> o <i>Theileria equi</i>	Pág. 45
6.2. Prevalencia de <i>Theileria equi</i>	Pág. 48
6.3. Ciclo de vida y transmisión del género <i>Theileria</i>	Pág. 49
6.4. Diagnóstico de la infección por <i>Theileria equi</i>	Pág. 53
6.5. Tratamiento y control de la theileriosis equina	Pág. 59
7. DESCRIPCIÓN DE LOS TRES ESTUDIOS INCLUIDOS EN LA TESIS	Pág. 67
8. BIBLIOGRAFÍA	Pág. 73
9. <u>ESTUDIO I</u>. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y LABORATORIALES, INCLUYENDO PROTEÍNAS DE FASE AGUDA, EN CABALLOS PURA RAZA ESPAÑOLA POSITIVOS A <i>THEILERIA EQUI</i>.....	Pág.87
9.1. INTRODUCCIÓN.....	Pág. 89
9.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	Pág. 90
9.3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	Pág. 92
9.3.1. Caracterización clínica de la theileriosis equina.....	Pág. 92
9.3.2. Hallazgos hematológicos en caballos infectados por <i>Theileria equi</i>	Pág. 95
9.3.3. Hallazgos laboratoriales bioquímicos en caballos infectados por <i>Theileria equi</i>	Pág. 98
9.3.4. Respuesta de fase aguda y proteínas de fase aguda: introducción	Pág. 100
9.3.4.1. Amiloide sérico A	Pág. 103
9.3.4.2. Proteína C reactiva	Pág. 106

9.3.4.3. Haptoglobina	Pág. 107
9.3.4.4. Fibrinógeno	Pág. 110
9.3.4.5. Otros marcadores de inflamación: leucograma e indicadores de metabolismo ...	Pág. 113
9.3.5. Relación entre inflamación y hemostasia. Alteraciones hemostáticas en procesos inflamatorios	Pág. 120
9.4. MATERIAL Y MÉTODOS	Pág. 125
9.4.1. Caballos	Pág. 125
9.4.2. Examen clínico	Pág. 126
9.4.3. Obtención y procesamiento de muestras sanguíneas.....	Pág. 126
9.4.4. Parámetros hematológicos	Pág. 127
9.4.5. Parámetros bioquímicos séricos	Pág. 127
9.4.6. Perfil hemostático	Pág. 128
9.4.7. Proteínas de fase aguda y metabolismo férrico	Pág. 128
9.4.8. Análisis estadístico	Pág. 129
9.5. RESULTADOS	Pág. 131
9.5.1. Examen clínico	Pág. 131
9.5.2. Análisis hematológico	Pág. 132
9.5.3. Análisis bioquímico	Pág. 134
9.5.4. Perfil de coagulación	Pág. 135
9.5.5. Proteínas de fase aguda y otros marcadores de inflamación	Pág. 136
9.5.6. Correlaciones entre parámetros clínicos, hematológicos, bioquímicos séricos y proteínas de fase aguda y marcadores de inflamación	Pág. 146
9.6. DISCUSIÓN.....	Pág. 153
9.6.1. Examen clínico	Pág. 153
9.6.2. Eritrograma.....	Pág. 156
9.6.3. Leucograma	Pág. 158
9.6.4. Bioquímica sérica	Pág. 159
9.6.5. Perfil de coagulación	Pág. 161

9.6.6. Proteínas de fase aguda	Pág. 163
9.7. CONCLUSIONES.....	Pág. 172
9.8. RESUMEN	Pág. 174
9.9. SUMMARY	Pág. 176
9.10. BIBLIOGRAFÍA.....	Pág. 178

10. ESTUDIO II. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO CLÍNICO, LABORATORIAL, DIAGNÓSTICO Y DE TRATAMIENTO EN CABALLOS AFECTADOS POR *THEILERIA EQUI* EN ANDALUCIA **Pág. 205**

10.1. INTRODUCCIÓN.....	Pág. 207
10.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	Pág. 209
10.3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	Pág. 211
10.3.1. Factores de riesgo intrínsecos del animal	Pág. 211
10.3.1.1. Especie animal.....	Pág. 211
10.3.1.2. Raza.....	Pág. 212
10.3.1.3. Sexo.....	Pág. 212
10.3.1.4. Edad.....	Pág. 213
10.3.1.5. Estado sanitario y nutricional	Pág. 215
10.3.2. Factores de riesgo asociados a las condiciones ambientales y prácticas de manejo	Pág. 216
10.3.2.1. Características del medio ambiente	Pág. 216
10.3.2.2. Instalaciones y explotaciones	Pág. 218
10.4. MATERIAL Y MÉTODOS	Pág. 220
10.4.1. Diseño del cuestionario	Pág. 220
10.4.2. Análisis estadístico	Pág. 222
10.5. RESULTADOS	Pág. 223
10.5.1. Datos relativos a los animales infectados	Pág. 223
10.5.2. Datos de manejo y ambientales	Pág. 226

10.5.3. Características clínicas de los animales infectados	Pág. 229
10.5.4. Procedimientos diagnósticos	Pág. 231
10.5.5. Procedimiento terapéutico seguido en los animales infectados.....	Pág. 233
10.6. DISCUSIÓN.....	Pág. 237
10.6.1. Datos relativos a los animales infectados	Pág. 237
10.6.2. Datos de manejo y ambientales	Pág. 239
10.6.3. Características clínicas de los animales infectados	Pág. 241
10.6.4. Procedimientos diagnósticos en los animales infectados	Pág. 242
10.6.5. Procedimiento terapéutico en los animales infectados	Pág. 243
10.7. CONCLUSIONES.....	Pág. 246
10.8. RESUMEN	Pág. 248
10.9. SUMMARY	Pág. 251
10.10. BIBLIOGRAFÍA.....	Pág. 253
11. <u>ESTUDIO III</u>. CASO CLÍNICO. INFECCIÓN SUBCLÍNICA POR <i>THEILERIA EQUI</i> Y RABDOMIÓLISIS EN TRES CABALLOS DE RESISTENCIA	Pág. 259
11.1. INTRODUCCIÓN.....	Pág. 261
11.2. DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS	Pág. 263
11.2.1. Descripción del caso 1	Pág. 263
11.2.2. Descripción del caso 2	Pág. 266
11.2.3. Descripción del caso 3	Pág. 270
11.3. DISCUSIÓN.....	Pág. 275
11.4. CONCLUSIONES.....	Pág. 280
11.5. RESUMEN	Pág. 281
11.6. SUMMARY	Pág. 283
11.7. BIBLIOGRAFÍA.....	Pág. 285

12. CONCLUSIONES GENERALES Pág. 291

13. RESUMEN GENERAL Pág. 295

14. MAIN SUMMARY Pág. 301

15. ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA TESIS (indicios de calidad)..... Pág. 307



1. LISTADO DE TABLAS

Tablas del estudio I

- Tabla 1.** Porcentajes de síntomas observados en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación).....Pág. 131
- Tabla 2.** Parámetros clínicos en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control).....Pág. 132
- Tabla 3.** Parámetros eritrocitarios en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control). Pág. 133
- Tabla 4.** Parámetros leucocitarios en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control)
.....Pág. 134
- Tabla 5.** Parámetros bioquímicos séricos en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control).
.....Pág. 135
- Tabla 6.** Perfil de coagulación en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control)Pág. 136
- Tabla 7.** Concentraciones de amiloide sérico, SAA, en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control)Pág. 137
- Tabla 8.** Concentraciones de proteína C reactiva, CRP, en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control)Pág. 137
- Tabla 9.** Concentraciones de haptoglobina, Hp, en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control)Pág. 138
- Tabla 10.** Concentraciones de fibrinógeno, FIB, en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control)Pág. 138

Tabla 11. Concentraciones de hierro, Fe, en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control).Pág. 139

Tabla 12. Concentraciones de ferritina, FERR, en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control)Pág. 139

Tabla 13. Concentraciones de la capacidad de unión del Fe no saturado, UIBC, en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control)Pág. 140

Tabla 14. Número y porcentaje de caballos PRE positivos a *Theileria equi* con valores de APPs superiores a los límites de referencia para la especie equina.....Pág. 140

Tabla 15. Parámetros clínicos en tres yeguas del grupo T-A con concentraciones elevadas de APPs, en comparación con el resto de yeguas del grupo T-A.....Pág. 141

Tabla 16. Parámetros eritrocitarios en tres yeguas del grupo T-A con concentraciones elevadas de APPs, en comparación con el resto de yeguas del grupo T-A.....Pág. 142

Tabla 17. Parámetros leucocitarios en tres yeguas del grupo T-A con concentraciones elevadas de APPs, en comparación con el resto de yeguas del grupo T-A.....Pág. 143

Tabla 18. Bioquímica sérica en tres yeguas del grupo T-A con concentraciones elevadas de APPs, en comparación con el resto de yeguas del grupo T-A.....Pág. 144

Tabla 19. Perfil de coagulación en tres yeguas del grupo T-A con concentraciones elevadas de APPs, en comparación con el resto de yeguas del grupo T-A.....Pág. 145

Tabla 20. Proteínas de fase aguda y marcadores de inflamación en tres yeguas del grupo T-A con concentraciones elevadas de APPs, en comparación con el resto de yeguas del grupo T-A.Pág. 146

Tabla 21. Coeficientes de correlación entre los parámetros clínicos y las concentraciones de proteínas de fase aguda y marcadores de inflamación en caballos PRE positivos a *Theileria equi*.Pág. 147

Tabla 22. Coeficientes de correlación entre el eritrograma y las concentraciones de proteínas de fase aguda y marcadores de inflamación en caballos PRE positivos a *Theileria equi*.Pág. 148

Tabla 23. Coeficientes de correlación entre el leucograma y las concentraciones de proteínas de fase aguda y marcadores de inflamación en caballos PRE positivos a *Theileria equi*.Pág. 149

Tabla 24. Coeficientes de correlación entre los parámetros bioquímicos séricos y las concentraciones de proteínas de fase aguda y marcadores de inflamación en caballos PRE positivos a *Theileria equi*.Pág. 150

Tabla 25. Coeficientes de correlación entre el perfil de coagulación y las concentraciones de proteínas de fase aguda y marcadores de inflamación en caballos PRE positivos a *Theileria equi*.Pág. 151

Tabla 26. Coeficientes de correlación entre las concentraciones de proteínas de fase aguda y marcadores de inflamación en caballos PRE positivos a *Theileria equi*. Pág. 151

Tablas del estudio II

Tabla 27. Información solicitada en el cuestionario en cada una de las secciones.Pág. 221

Tabla 28. Frecuencia de aparición de los síntomas en caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)
.....Pág. 231

Tabla 29. Tratamiento de soporte en caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)Pág. 234

Tablas del estudio III

Tabla 30. Parámetros clínicos del caballo del caso 1Pág. 264

Tabla 31. Resultados analíticos del caballo del caso 1, el día 1 tras la competición (A) y 2 meses después del tratamiento (B)Pág. 265

Tabla 32. Parámetros clínicos de la yegua del caso 2.....Pág. 267

Tabla 33. Resultados analíticos de la yegua del caso 2, al llegar a los servicios veterinarios durante la competición (A), 3,5 h después del tratamiento (B) y 1,5 meses después (C)Pág. 268

Tabla 34. Parámetros clínicos del caballo del caso 3 en la primera inspección veterinaria, tras abandonar la competiciónPág. 271

Tabla 35. Resultados analíticos del caballo del caso 3, a la llegada a los servicios veterinarios, tras su retirada de la competición (A), dos meses después del tratamiento (B)Pág. 273



2. LISTADO DE FIGURAS Y FOTOGRAFÍAS

Figuras del estudio II

Figura 1. Distribución por razas de los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)Pág. 223

Figura 2. Distribución por sexo de los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)Pág. 224

Figura 3. Distribución por grupos de edad de los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía).Pág. 225

Figura 4. Distribución por uso de los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)Pág. 225

Figura 5. Distribución por provincias de los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)Pág. 226

Figura 6. Distribución por meses en los que se realizó el diagnóstico de los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)Pág. 227

Figura 7. Temperaturas medias durante los meses en los que se realizó el diagnóstico de los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)Pág. 228

Figura 8. Humedades relativas medias durante los meses en los que se realizó el diagnóstico de los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)Pág. 228

Figura 9. Manejo de los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)Pág. 229

Figura 10. Motivo de la consulta en los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)Pág. 230

Figura 11. Uso de la hematología como método de diagnóstico complementario en caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)Pág. 232

Figura 12. Uso de la bioquímica plasmática/sérica como método de diagnóstico complementario en caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)Pág. 232

Figura 13. Método específico de diagnóstico en los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía).Pág. 233

Figura 14. Quimioterapia específica en los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)Pág. 234

Figura 15. Duración del proceso en los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)Pág. 235

Figura 16. Evolución del proceso en los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)Pág. 236

Figuras del estudio III

Figura 17. Curva de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa de *Theileria equi* en caballosPág. 263

Fotografías

FOTO 1. Muestra de sangre de un caballo con *Theileria equi*Pág. 55

FOTO 2. Orina en un caballo de raid con rabdomiólisis, al inicio (primera jeringa por la izquierda) y en respuesta a la fluidoterapiaPág. 269

FOTO 3. Caballo de raid del caso 3. Se observa una contractura en el miembro pelviano derecho y un aumento de tamaño de la musculatura glútea en el miembro pelviano izquierdoPág. 272



3. LISTADO DE ABREVIATURAS

Aa: Angloárabe
ADN: Ácido dexosi-ribonucleico
ALB: Albúmina
ALP: Fosfatasa alcalina (“*alkaline phosphatase*”)
ALT: Alanina aminotransferasa (“*Alanine aminotransferase*”)
ANCCE: Asociación Nacional de Criadores de caballos Españoles
APP: Proteínas de fase aguda (“*Acute phase proteins*”)
aPPT: Tiempo de protrombina parcial activada (“*Acute partial thromboplastine time*”).
APR: Respuesta de fase aguda (“*Acute phase response*”)
AST: Aspartato aminotransferasa (“*Aspartate aminotransferase*”)
BAS: Polimorfonucleares basófilos
BIL: Bilirrubina
BUN: Urea (“*Blood ureic nitrogen*”)
Ca: Calcio
CDE: Caballo de deporte español
cELISA: Análisis inmunoenzimático de competición
CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media
CID: Coagulación intravascular diseminada
CFT: Test de fijación del complemento (“*Complement fixation test*”)
CK: Creatín Kinasa
ClK: Cloruro sódico
CREAT: Creatinina
CRP: Protein C reactiva (“*C reactive protein*”)
EOS: Polimorfonucleares eosinófilos
EPA: Departamento de Agricultura, Servicio de Inspección de Animales y Plantas, Estados Unidos (“*United States Department of Agriculture, Animal and Plant Inspection Service*”)
ELISA: Análisis inmunoenzimático
FC: Frecuencia cardiaca
Fe: Hierro
FERR: Ferritina
FIB: Fibrinógeno

FLP: Proteínas similares al fibrinógeno (“*fibrinogen- like proteins*”)
FR: Frecuencia respiratoria
GB: Glóbulos blancos
GGT: Gamma- glutamil transferasa
GLU: Glucosa
GR: Glóbulos rojos
h: Horas
Ha: Hispanoárabe
HB: Concentración de hemoglobina
HCM: Hemoglobina corpuscular media
HDL: Lipoproteínas de alta densidad (“*High density lipoproteins*”)
HMWK: Quininógeno de alto peso molecular (“*High molecular weight quininogen*”)
Hp: Haptoglobina
HTO: Valor hematócrito
IAD: Enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias (“*Inflammatory airway disease*”)
IFAT: Ensayo de inmunofluorescencia indirecta
Ig: Inmunoglobulina
IL-1: Interleukina 1
IL-6: Interleukina 6
IM: Intramuscular
IRP: Proteínas reguladoras del hierro (“*Iron regulatory proteins*”)
IV: Intravenoso
Km: Kilómetros
LDH: Lactato deshidrogenasa
LINF: Linfocitos
Max: Máximo
Mg: Magnesio
Min: Mínimo
MON: Monocitos
Na: Sodio
NEU: Polomorfonucleares neutrófilos
OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal (“*Oficina internacional de epizootias*”)

OR: Coeficiente de probabilidad (*‘odds ratio’*)
P: Fósforo
PARs: Receptores activados por proteasa (*“Protease-activated receptor”*)
PAR1: Receptores activados por proteasa 1 (*“Protease-activated receptor 1”*)
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*“Polymerase reaction chain”*)
PDFs: Productos derivados del fibrinógeno
PLT: Número de plaquetas
PRá: Pura Raza árabe
PRE: Pura Raza Española
PT: Proteínas totales
PPT: Proteínas plasmáticas totales
RAO: Obstrucción de las vías respiratorias (*“Recurrent airway disease”*)
ROS: Especies reactivas de oxígeno (*“Reactive oxygen species”*)
SAA: Amiloide sérico A (*“Serum amyloid A”*)
SDH: Sorbitol deshidrogenasa
Se: Selenio
SIRS: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (*“Systemic inflammatory response syndrome”*)
TIBC: Capacidad total del unión al hierro (*“Total iron binding capacity”*)
TNF: Factor de necrosis tumoral (*“Tumor necrosis factor”*)
TR: Temperatura rectal
TRC: Tiempo de relleno capilar
TPT: Tiempo de protrombina
TT: Tiempo de trombina
UIBC: Capacidad de unión al hierro no saturado (*“Unsaturated iron binding capacity”*)
USDA: Departamento de Agricultura de Estados Unidos
USA: Estados Unidos de América (*“United States of America”*)
VCM: Volumen corpuscular medio
vWF: Factor de von Willebrand



4. INTRODUCCIÓN GENERAL

La piroplasmosis es una enfermedad parasitaria causada por protozoos hematotrópicos del género *Babesia*, familia Babesiidae, orden Piroplasmida y Phylum Apicomplexa, y por los parásitos del género *Theileria*, familia Babesiidae, orden Piroplasmida y Phylum Apicomplexa, transmitidos por garrapatas (Laveran 1901). Ambos géneros se denominan vulgarmente como piroplasmas, son parásitos hemáticos de los animales domésticos, y en menor grado del hombre (Laveran 1901).

Diversas especies de estos parásitos afectan al ganado, perros, caballos y roedores, y por tanto, son enfermedades parasitarias de gran importancia económica. Además, esta enfermedad ha ganado cada vez más atención como problema zoonótico. Las infecciones pueden aparecer de forma subclínica, pero también pueden ser severas y a veces mortales, debido al desarrollo intraeritrocitario del parásito (Mehlhorn y Schein, 1998).

La piroplasmosis equina, que afecta a todas las especies de équidos, incluyendo caballos, burros, mulos y cebras, está causada por *Babesia caballi* y/o *Theileria equi*. Clínicamente se caracteriza por anemia hemolítica, fiebre, ictericia, hemoglobinuria, bilirrubinuria y muerte en casos severos (Wise et al., 2013; 2014). Los síntomas clínicos, sobre todo en zonas endémicas, no son patognomónicos, y a menudo son difíciles de reconocer, ya que diversos factores, como dosis infectiva, genética de los parásitos y estado inmune del hospedador, contribuyen al grado de severidad (Moretti et al., 2010; Wise et al., 2013; Laus et al., 2015).

El agente no sobrevive fuera de sus hospedadores y sólo se puede transmitir mediante la picadura de una garrapata vector. Una característica de la piroplasmosis es que puede ser transmitida por la sangre y, por tanto, a través de una inyección accidental o iatrogénica (Gerstenberg et al., 1998), por vía transplacentaria (Allsopp et al., 2007) y por tanto puede aparecer de forma congénita. También se ha descrito infección de los potros en útero, dando como resultado abortos a término o nacimiento de crías vivas, que desarrollan los signos de la enfermedad poco después del nacimiento (De Waal y Van Heerden 1994; Allsopp et al., 2007).

La prevalencia de la enfermedad es elevada en nuestro país y ocasiona problemas graves. En el año 2013, se publicó un estudio sobre la prevalencia y factores de riesgo en caballos con infección por *Theileria equi* en Andalucía, encontrándose con una seroprevalencia general del 56,1 % (García-Bocanegra et al., 2013). La seroprevalencia de *Theileria equi* fue de un 66,1% en mulas, 48,6% en caballos y 47,2% en burros (García-Bocanegra et al., 2013).

Aunque las pérdidas económicas relacionadas con esta enfermedad no están disponibles ni son fácil de cuantificar, los informes de las enfermedades y muertes en centros de equitación o yegadas no son infrecuentes en áreas endémicas (Kuttler, 1998). La importancia de la piroplasmosis equina radica particularmente, en las restricciones a los viajes de los caballos positivos. La piroplasmosis equina es una enfermedad de la lista B de la OIE (Oficina Internacional de Epizootías), de declaración obligatoria dentro de las 72h del diagnóstico. Sólo los caballos seronegativos pueden viajar a Estados Unidos, Canadá, Australia y Japón (Friedhoff et al., 1990).

Esta enfermedad adquiere una gran importancia en caballos Pura Raza Española (PRE). Esta raza, no sólo triunfa en nuestro país, sino también en el extranjero, en disciplinas como Doma Clásica, como hemos podido comprobar con Fuego XII y con todo el equipo olímpico español en los Juegos Equestres Mundiales de Kentucky (USA). En estos Juegos Equestres, las autoridades estadounidenses hicieron una excepción y permitieron la entrada de caballos serológicamente positivos a piroplasmosis. Estos animales, durante el transcurso de los Juegos Equestres, se mantuvieron en un recinto apartado para evitar el contagio con los animales serológicamente negativos. La prevalencia y la importancia clínico-económica de esta enfermedad en Andalucía, nos ha llevado al diseño y realización de la presente investigación.



5. OBJETIVOS GENERALES E HIPÓTESIS

La presente investigación ha sido realizada para incrementar nuestro conocimiento sobre las características clínicas y laboratoriales de la theileriosis en Andalucía, ya que es bien conocida la alta prevalencia de esta patología en los caballos de esta región. Como objetivos particulares, se plantean los siguientes:

Primer objetivo. Conocer la sintomatología asociada a la infección por *Theileria equi* en caballos PRE pertenecientes a zonas endémicas, definiendo las principales alteraciones hematológicas y bioquímicas, analizando si este parásito desencadena una respuesta de fase aguda en los animales afectados y evaluando si existen diferencias entre animales estabulados, presuntivamente con menor contacto con el vector y animales en pastoreo, con una posibilidad superior de contacto con el vector.

Segundo objetivo. Definir las características de los caballos con theileriosis clínica en Andalucía y las condiciones ambientales bajo las cuales se lleva a cabo el proceso infeccioso, describiendo cuales son los motivos que llevan a los propietarios a consultar a sus veterinarios, los síntomas que más comúnmente encuentran estos clínicos, en qué procedimientos basan su diagnóstico y qué tratamiento consideran más efectivo.

Tercer objetivo. Describir casos clínicos específicos en caballos de deporte, con pérdida de rendimiento en competición, asociados a la infección por *Theileria equi*.

Como HIPÓTESIS DE PARTIDA, se proponen las siguientes:

Primera hipótesis. Que los caballos positivos a *Theileria equi*, pertenecientes a zonas endémicas, presentarán síntomas y características laboratoriales de intensidad leve, debido a contactos continuos con el parásito, por lo que la respuesta inflamatoria a la presencia del parásito será, igualmente, de baja intensidad.

Segunda hipótesis. Que los caballos positivos a *Theileria equi* y que se mantienen en pastoreo tendrán manifestaciones clínicas y laboratoriales de mayor intensidad en

comparación con los caballos en estabulación e igualmente, la inflamación desencadenada por el parásito será más intensa en animales en pastoreo.

Tercera hipótesis. Que la encuesta obtenida de los veterinarios clínicos de Andalucía revelará que los animales que recibieron tratamiento, estaban fundamentalmente en pastoreo, que el método diagnóstico de elección será la serología, a pesar de tratarse de una zona endémica y que los tratamientos de predilección serían dipropionato de imidocarb y/o buvarpacuona.

Cuarta hipótesis. Que los caballos de deporte, ausentes de sintomatología de theileriosis, pueden desarrollar síntomas compatibles con esta infección cuando están en competición o tras la misma, dando lugar a pérdida de rendimiento deportivo.



6. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

6.1. DESCRIPCIÓN DEL PARÁSITO: *Babesia equi* o *Theileria equi*

La piroplasmosis equina o babesiosis es una enfermedad infecciosa transmitida por garrapatas, producida por parásitos hematoprotozoarios, y que afecta a todas las especies equinas incluyendo caballos, mulas, asnos y cebras (Schein, 1988; Friedhoff et al., 1990; De Waal, 1992; Wise et al., 2013; Abedi et al., 2015; Bartolomé del Pino et al., 2016). La piroplasmosis también se conoce en la literatura como babesiosis, theileriosis o fiebre biliar. Los agentes etiológicos de la piroplasmosis equina son *Babesia caballi* y *Theileria equi*. Los géneros *Babesia* y *Theileria* pertenecen a las familias Babesiidae y Theileriidae. El término de piroplasma deriva de la apariencia en forma de pera intraeritrocitaria de las formas replicativas (Schein, 1998; Wise et al., 2013).

Los piroplasmas son miembros del Phylum Apicomplexa, que también incluye los géneros Plasmodium, Cryptosporidium y Toxoplasma. *Babesia caballi* es considerado como un verdadero organismo *Babesia* porque se replica exclusivamente dentro de los eritrocitos en el huésped vertebrado. La taxonomía de los agentes causales de la piroplasmosis ha sido cuestionada desde su descubrimiento y en la actualidad, existe incertidumbre en cuanto a la taxonomía apropiada para *Theileria equi* (Mehlhorn y Schein, 1998; Hikosaka et al., 2010; Kappmeyer et al., 2012; Wise et al., 2013). Aunque se considera una "pequeña *Babesia*," *Theileria equi* tiene varias características que la diferencian de otras especies dentro del género. El parásito, denominado *Piroplasma equi* (reclasificado más tarde como *Babesia equi*), fue reconocido como agente causal de enfermedad por primera vez en Sudáfrica en el año 1901. Unos años más tarde, se descubrió que eran dos parásitos distintos los que podían infectar a los eritrocitos de los équidos, aunque uno era significativamente mayor que el otro. Al mayor de los parásitos se le denominó *Piroplasma caballi*, para ser posteriormente reclasificado como *Babesia caballi*. Mientras que *Babesia caballi* es considerado un clásico "*Babesia*", la taxonomía de *Babesia equi* sigue siendo polémica, debido en parte a encontrar una etapa extra-eritrocitaria en las especies equinas. Por este motivo, *Babesia equi* fue reclasificada como *Theileria equi* en 1998 (Mehlhorn y Schein, 1998; Wise et al., 2013; 2014). Las investigaciones filogénicas más recientes indican que el organismo posee características de ambas líneas, *Babesia* y

Theileria, colocándose posiblemente entre las dos (Allsopp et al., 2006; 2007; Wise et al., 2013; 2014). Los análisis genómicos actuales revelan un género nuevo para *Theileria equi* (Kappmeyer et al., 2012).

En la mayoría de los países tropicales y subtropicales la enfermedad es endémica, debido a que las condiciones ambientales facilitan la presencia, tanto de los vectores naturales (garrapatas) como del parásito (Heim et al., 2007; Salim et al., 2008; Dos Santos et al., 2011; Ribeiro et al., 2013; Bhagwan et al., 2015; Laus et al., 2015; Oduori et al., 2015; Liu et al., 2016; Ferreira et al., 2016). Se han identificado 15 especies de garrapatas de tipo ixódido pertenecientes a los géneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus* y *Hyalomma* como vectores horizontales de *Babesia caballi* y *Theileria equi* (Bhagwan et al., 2015; Hawkins et al., 2015; Jongejan et al., 2015), aunque ocho de estas especies fueron también capaces de transmitir las infecciones por *Babesia caballi* transováricamente (Moltmann et al., 1983; Ikadai et al., 2007; Ueti et al., 2007). Más recientemente, se ha confirmado que *Haemaphysalis longicornis* puede intervenir en la transmisión de *Theileria equi* (Ikadai et al., 2007) así como las garrapatas de los géneros *Boophilus microplus* (Battsetseg, 2002) y *Amblyomma cajennense* (Scoles y Ueti, 2013). Los animales infectados pueden permanecer como transportadores de estos parásitos sanguíneos por largos periodos de tiempo, actuando como fuentes de infección para las garrapatas vector (Iori et al., 2010; Wise et al., 2013).

Debido a su longevidad y movilidad, las garrapatas machos pueden transmitir *Theileria equi* a varios caballos (Friedhoff y Soule, 1996). Es importante destacar que, *Boophilus microplus* puede adquirir y transmitir *Theileria equi* incluso cuando se alimenta de caballos portadores inaparentes con un bajo nivel de parasitemia (porcentaje de eritrocitos infectados) (Ueti et al., 2005).

El descubrimiento del vector *Dermacentor reticulatus* en los Países Bajos en 2010 combinado con el reconocimiento de un caballo subclínico infectado por *Babesia caballi* condujo a una vigilancia del área que resultó en la identificación de varios caballos con *Theileria equi* y *Babesia caballi* (Scoles et al., 2011). Antes de 2009, sólo se habían identificado 2 especies de garrapatas que transmitieran *Theileria equi* de forma natural en

las partes más meridionales de Estados Unidos: *Dermacentor nitens* y *Rhipicephalus microplus*. A consecuencia de un brote en Texas, se descubrió que la transmisión se podía producir por 4 especies diferentes de garrapatas: *Anocenter cajennense*, *Anocenter maculatum*, *Dermacentor (Anocenter) nitens* y *Dermacentor variabilis*. *Anocenter cajennense* fue el más abundante, encontrándose aproximadamente en un 79% de los infectados, seguido de *Anocenter maculatum* (19%), *Dermacentor variabilis* (16%) y *Dermacentor nitens* (3%). Antes de este brote, *Anocenter cajennense* no había sido identificado como un vector para *Theileria equi* (Estrada-Pena, 2004; Wise et al., 2013).

El papel de *Anocenter maculatum* sigue siendo poco claro y, aunque *Dermacentor nitens* es un vector conocido de *Babesia caballi*, no está claro si es vector de *Theileria equi*. Las garrapatas adultas de *Dermacentor variabilis* recogidas de los caballos infectados en el rancho de Texas fueron capaces de transmitir experimentalmente enfermedad a otros caballos, pero su papel como vector natural en este brote sigue siendo cuestionable (Scoles et al., 2011; Wise et al., 2013).

Inicialmente, el pequeño piroplasma de los equinos se denominó *Piroplasma equi* (Laveran, 1901). El nombre del género fue cambiado posteriormente (Nutall y Strickland, 1910). Desde el principio, *Babesia caballi* y *Theileria equi* fueron consideradas especies diferentes por algunos autores. La razón principal era la diferencia en la división en dos o en cuatro células hijas. También se conocía que existían diferencias en el tipo de transmisión en las garrapatas (Sigrist, 1983). Esta circunstancia, junto con el descubrimiento de los esporozoitos en los linfocitos de los caballos (Schein et al., 1981), hizo que *Theileria* no se pudiera mantener dentro del género *Babesia*. Inicialmente *Babesia equi* fue clasificada como una especie de babesia intralinfocitaria (Melhorn y Schein, 1998), si bien otros autores más arriesgados la llamaron *Theileria equi* (Uilenberg, 1986; Euzeby et al., 1988), denominación que se acepta en la actualidad.

6.2. PREVALENCIA DE *THEILERIA EQUI*

Muy pocos países se consideran libre de infecciones autóctonas por theileriosis en la actualidad y se estima que tan sólo un 10% de los caballos habitan en zonas libres de esta enfermedad (Rothschild, 2013). Los países considerados no endémicos para piroplasmosis equina según la OIE son Estados Unidos, Canadá, Islandia, Reino Unido, países del norte de Europa, Irlanda, Singapur, Japón, Nueva Zelanda y Australia. No obstante, muchas de las zonas libres de piroplasmosis en équidos son climáticamente adecuadas para los vectores (De Waal, 1992), por lo que existe un riesgo continuo de introducción en estas áreas, bien a partir de caballos, bien a partir de garrapatas infectadas (Rothschild, 2013).

La OIE considera zonas endémicas a América Central y del Sur, Cuba, África, Asia, Oriente Medio y Sur de Europa. En América del Sur, la enfermedad es fácilmente identificable en todas las regiones, así como en las zonas más meridionales de Chile y Argentina. La prevalencia y distribución de la infección dentro de las naciones caribeñas es cuestionable, pero la enfermedad se ha descrito en la mayoría de las islas, incluyendo Trinidad y Cuba (Asgarali et al., 2007). No todos los países informan de los casos identificados a la OIE, por lo que un conocimiento preciso de la situación y distribución del parásito es difícil. No obstante, en los últimos años, se han llevado a cabo numerosas investigaciones de prevalencia serológica que han puesto de manifiesto la gran extensión de esta infección. De este modo, se han publicado datos de prevalencia en países de Centro y Sudamérica como México (Ayala-Valdovinos et al., 2017), Brasil (Cantú-Machado et al., 2012; Martínez et al., 2012; Ferreira et al., 2016), Costa Rica (Posada-Guzmán et al., 2015) o Venezuela (Mujica et al., 2011; Rosales et al., 2013). De igual modo, *Theileria equi* es común en Europa, fundamentalmente en Italia (Grandi et al., 2011; Piantedosi et al., 2014; Bartolomé del Pino et al., 2016), Portugal (Ribeiro et al., 2013; Ferrolho et al., 2016), Polonia, Ucrania y Eslovaquia (Slivinska et al., 2016), Bélgica y Holanda (Butler et al., 2012; Jongejan et al., 2015), Suiza (Sigg et al., 2010), Grecia (Kouam et al., 2010), Turquía (Guven et al., 2017) y España (Adaszek et al., 2012; García-Bocanegra et al., 2013). Otros países a destacar, con una importante seroprevalencia son la India (Sumbria et al., 2016), Egipto (Mahmoud et al., 2016), Kenia (Oduori et al., 2015), Jordania (Qablan et al., 2013),

Túnez (Ros-García et al., 2013), Sudáfrica (Bhoora et al., 2010) y Sudán (Salim et al., 2010). No obstante, algunos de estos países no se consideran endémicos, ya que la OIE no recibe información de forma rutinaria.

En cuanto a España, el primer estudio de seroprevalencia se llevó a cabo en el suroeste, en Extremadura (Coletto, 1999; Habela et al., 1999). Habela et al. (1999), encontraron un 77,1% y un 64,2% de caballos seropositivos a *Theileria equi* y a *Babesia caballi* respectivamente en la citada región. Posteriormente, Camacho et al. (2005) compararon los hallazgos laboratoriales de caballos positivos a *Theileria equi* y *Babesia caballi*, con un grupo control. Esta investigación se realizó en el noroeste de España, en Galicia, si bien no se aportaron datos relativos a epidemiología. Más recientemente, García-Bocanegra et al. (2013), han presentado resultados relativos al sur de España, a Andalucía. Sobre un número elevado de équidos (n= 537), incluyendo burros, mulos y caballos, estos autores encontraron que 64 animales fueron seropositivos (utilizando la técnica de análisis inmunoenzimático ELISA) a *Babesia caballi*, 270 a *Theileria equi* y 45 a ambos parásitos.

Debido a que *Theileria equi* y *Babesia caballi* comparten los mismos vectores en una zona concreta, su infección suele estar íntimamente asociada en climas tropicales y subtropicales. En la mayor parte de las regiones, no obstante, las infecciones por *Theileria equi* son más comunes que las de *Babesia caballi* (Wise et al., 2013; 2014; Rothschild, 2013).

6.3. CICLO DE VIDA Y TRANSMISIÓN DEL GÉNERO THEILERIA

Como se ha comentado anteriormente, la piroplasmosis se diagnostica en la mayoría de los países del mundo y la infección se mantiene dentro de las poblaciones equinas mientras existan vectores competentes. Para *Theileria equi*, el reservorio es el équido persistentemente infectado. Sin embargo, para *Babesia caballi*, tanto caballos infectados como el vector primario (garrapatas) son reservorios (Piantedosi et al., 2014; Van Vuuren y Penzhorn, 2015). El incremento en la densidad de caballos y de garrapatas

infectadas provocará un aumento de la infección y potencialmente de la enfermedad. Las formas más frecuentes de transmisión de la enfermedad son a través de garrapatas infectadas y por transmisión iatrogénica (Torina et al., 2007; Wise et al., 2013). Sin embargo, la presencia de un vector garrapata competente y de caballos infectados dentro de la misma área no siempre conduce a nuevas infecciones o enfermedades. Se deben considerar muchos factores, incluyendo estación, clima, especificidad del huésped (edad, estado inmune) y las peculiaridades del ciclo de vida de la garrapata (Abutarbush et al., 2012; Steinman et al., 2012; García-Bocanegra et al., 2013; Piantedosi et al., 2014; Guidi et al., 2015; Sumbria et al., 2016).

El ciclo de vida de una garrapata consta de 4 etapas de vida: huevo, larva, ninfa y adulto. Después de la eclosión del huevo, la larva se alimenta de su huésped y muda a ninfa. La ninfa entonces se alimenta y muda a adulto. Las hembras y los machos pasan por estas etapas de la vida, si bien la hembra muere después de poner sus huevos. Las garrapatas se clasifican como garrapatas duras (Ixodidae) o garrapatas blandas (Argasidae) (Wise et al., 2013). Ambos son vectores para transmisión de patógenos, pero sólo las garrapatas duras son naturales vectores para *Babesia caballi* y *Theileria equi* (Sonenshine, 1991; Scoles y Ueti, 2015).

La transmisión del parásito dentro de las garrapatas puede ocurrir de 3 formas: intraestadial, transestadial o transovárica. La transmisión intraestadial ocurre cuando la adquisición y transmisión del parásito se lleva a cabo dentro de una etapa de la vida de la garrapata (ninguna transición de la etapa antes de la transmisión). La transmisión transestadial describe la adquisición de la infección en una etapa del ciclo vital de la garrapata y la capacidad de transmitir la infección durante etapas subsiguientes del desarrollo. Por tanto, el parásito se mantiene dentro de la garrapata a medida que ésta se desarrolla a través de sus diferentes fases del ciclo biológico. La transmisión transovárica se produce cuando la garrapata hembra adquiere parásitos, que entran en los ovarios y se transmiten a su descendencia, permitiendo el mantenimiento de los parásitos a través de varias generaciones de garrapatas (Ueti et al., 2008; Wise et al., 2013). Se han identificado varias especies de garrapatas ixódidas como vectores naturales o experimentales de

piroplasmosis. Como la presente investigación se centra en *Theileria equi*, a continuación, se describe más en detalle el ciclo biológico de este parásito.

Theileria equi es un parásito hemático, que se localiza en eritrocitos, linfocitos, macrófagos, histiocitos..., siempre como parásito intracelular (Ramsay et al., 2013; Rothschild, 2013; Wise et al., 2013; 2014). Su morfología intraeritrocitaria es similar a la del género *Babesia*, si bien son más frecuentes las formas ovaladas y su tamaño es inferior (2 mm). Los vectores de *Theileria* son las garrapatas de los géneros *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Hyaloma*, *Boophilus* y *Haemaphysalis*. El ciclo de vida de *Theileria equi* implica distintas etapas en el huésped. El parásito progresa a través de tres estadios de vida, el esporozoito (fase de transmisión asexual), el merozoito (estadio de sangre; asexual) y el gametocito (estadio de sangre sexual) (Schein et al., 1981; Moltmann et al., 1983; Mehlhorn y Schein, 1998; Wise et al., 2013; 2014). La duración del período de incubación extrínseca, es decir, del tiempo de replicación del parásito en el vector de transmisión, no está definido para *Theileria equi*.

Su ciclo biológico se inicia cuando una garrapata parasitada se alimenta sobre un caballo sano, inoculando los elementos infectivos o esporozoitos, los cuales se introducen en los linfocitos, macrófagos.... En ellos, constituyen una vacuola parasitófora, donde se multiplican asexualmente por merogonia. El parásito induce así, la división de los linfocitos, y tras nueve días de maduración, se produce la rotura posterior celular y liberación de merozoitos, los cuales aparecerán en números elevados en ganglios linfáticos y bazo (Wenyon, 1926; Mehlhorn y Schein, 1984; De Waal, 1992). Algunos merozoitos pueden desarrollar formas de gametocitos y encontrarse en sangre periférica de los équidos. El tamaño de estos merozoitos queda comprendido entre 1,5 y 2 mm de longitud.

Seguidamente, los merozoitos se introducen en los eritrocitos, donde experimentan una fase de multiplicación, que también es merogonia, pero con la aparición de 2 células hijas, piriformes y con un tamaño de 2-3 mm (Rothschild, 2013). Las células formadas mediante esta división se introducen de nuevo en los hematíes, transformándose en gametocitos, que no se dividen, pero que continuarán el ciclo en la garrapata (Mehlhorn y Schein, 1984; Wise et al., 2013; 2014).

Cuando una garrapata se alimenta de caballos con eritrocitos con gametocitos, éstos forman gametos en la luz intestinal en forma anisogámica. Ahora los parásitos se reproducen sexualmente formando los gametocitos, la unión de los gametos conforma el cigoto, que entra en las células intestinales de la garrapata, transformándose en un quineto (Wise et al., 2013). Los cigotos se desarrollan de manera diferente, dependiendo de la especie de garrapata, donde perduran un periodo de 6 a 24 días, hasta la muda de la garrapata. Al producirse ésta, el quineto del intestino se desplaza, cae a la cavidad de la garrapata y por la hemolinfa, llega a las glándulas salivales, entrando en las células y realizando en su interior la esporogonia (Moltmann et al., 1983; Guimaraes et al., 1998). Esta última fase se encuentra condicionada a que exista una fase de muda. Tras la muda, la garrapata empieza a alimentarse, para que se desarrollen las glándulas salivales (Rudzinska et al., 1984).

La transmisión de este género se denomina “transmisión fase a fase”, ya que implica una muda y el parásito se transmite en la siguiente fase a la fase en la que se ha infectado. Es decir, si una larva se infecta, la posibilidad de que transmita en estado adulto es nula, sólo será infectiva en la fase de ninfa. Otra cuestión es que siendo ninfa e infectando como tal, adquiera de nuevo gametocitos (Oliveira y Kreier, 1979).

La transmisión placentaria de yeguas portadoras infectadas a sus fetos se ha documentado en varios estudios (Phipps y Otter 2004; Robert et al., 2005; Allsop et al., 2007; Georges et al., 2011; Chhabra et al., 2012; Sudan et al., 2015). Esta transmisión puede resultar en aborto, muerte fetal o infección neonatal y puede ocurrir a través de placentas histológicamente normales. La prevalencia de este tipo de transmisión no se conoce en la actualidad. Se ha publicado que *Theileria equi* es responsable del 11% de todos los abortos en équidos en Sudáfrica (Lewis et al., 1999). Es probable que la genética individual de cada caballo o el aislamiento geográfico provoquen diferencias en las cepas, que podrían influir en la transmisión placentaria. La exposición al semen de un semental infectado no se considera un medio de transmisión, pero la contaminación sanguínea durante la cría podría conllevar un riesgo de transmisión (Metcalf, 2001).

En la mayoría de los casos, la infección se convierte en persistente y los caballos persisten como portadores inaparentes, papel vitalicio en el caso de *Theileria equi*. Se supone que la infección subclínica persistente se debe en parte al secuestro del organismo y a las estrategias de evasión por parte del parásito mediante la inmunidad. Existen varias teorías sobre la localización del parásito en caballos asintomáticos: los capilares del sistema nervioso central, el sistema vascular y la médula ósea (Holbrook y Frerich, 1968; Pitel et al., 2010; Butler, 2013; Rothschild, 2013; Wise et al., 2013; 2014).

La transmisión puede ocurrir también de forma iatrogénica, mezclando sangre de animales infectados y no infectados (Gerstenberg et al., 1999; Scoles et al., 2011; Short et al., 2012; Ueti et al., 2012). Esto ocurre más comúnmente por la mala práctica de compartir agujas entre caballos positivos y negativos, así como por el uso de cualquier equipo contaminado con sangre. La infección también puede estar causada cuando caballos infectados crónicamente se utilizan como donantes de sangre para otros caballos. De hecho, la práctica ilegal de transfusiones sanguíneas previas a la competición parece que estuvo implicada en el brote de la Florida de 2008 (Short et al., 2012). De forma experimental, se ha confirmado la infección por vías intravenosa y subcutánea, así como por la transmisión de garrapatas (Tenter y Frieddhoff, 1986; De Waal et al., 1988; Ueti et al., 2008; Grause et al., 2013).

6.4. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *THEILERIA EQUI*

El diagnóstico clínico de la piroplasmosis equina se realiza en base a los signos clínicos, apoyados por los resultados de los análisis laboratoriales, incluyendo el examen de frotis de sangre, la titulación antigénica y la evidencia de la presencia del protozoo a partir de la valoración de su ADN (Baldani et al., 2011; Abutarbush et al., 2012; Baptista et al., 2013; Rosales et al., 2013; Wise et al., 2013; 2014; Alanazi et al., 2014; Sumbria et al., 2015; Ayala-Valdovinos et al., 2017), siendo común el uso conjunto de diversas modalidades de diagnóstico. Durante la gestión de un brote dentro de una zona no endémica, es necesaria la participación del estado y de las agencias reguladoras nacionales,

así como la utilización de múltiples métodos de diagnóstico, para obtener la información más exacta. Sólo unos pocos laboratorios en el mundo están autorizados para realizar determinadas pruebas, por lo que las muestras y su tratamiento son cruciales.

Los signos clínicos son, a menudo, inespecíficos y la enfermedad puede ser confundida con una variedad de enfermedades, tales como la gripe equina, infecciones por el virus de la encefalitis, anemia infecciosa equina y tripanosomiasis. No es posible diferenciar entre infecciones por *Theileria equi* y *Babesia caballi* en base sólo en la sintomatología clínica (Wise et al., 2013). Por tanto, en cuanto al diagnóstico, se requieren dos alternativas fiables que son la titulación antigénica y la evidencia de la presencia del protozoo.

Los hallazgos macroscópicos y histopatológicos en la necropsia varían dependiendo de la gravedad de la enfermedad y las complicaciones asociadas. El examen general puede mostrar evidencias de anemia, así como diversos grados de ictericia, edema y esplenomegalia. Otros hallazgos de necropsia son, edema y congestión pulmonar, hemorragias cardíacas, hidropericardio, hidrotórax, hepatomegalia, ascitis, riñones descoloridos, agrandados y linfadenopatía (De Waal, 1992). Los hallazgos histopatológicos revelan necrosis hepato-centrolobulillar, necrosis tubular renal, con moldes de hemoglobina y microtrombos dentro de hígado y pulmones (De Waal y Van Heerden, 2004). El examen del tejido pulmonar puede demostrar congestión, edema y macrófagos cargados de hemosiderina dentro de las paredes alveolares pulmonares. Los parásitos pueden observarse dentro de los glóbulos rojos de los vasos sanguíneos y en el interior de los macrófagos (Taylor et al., 1969; Mahoney et al., 1977).

Tradicionalmente, los piroplasmas se han detectado e identificado mediante examen microscópico de extensiones de sangre de animales con infección aguda. En ocasiones, el periodo de incubación es menor que el de prepatencia. Es posible que transcurra uno o varios días desde que el animal comience con un cuadro febril, hasta que se evidencie la presencia de *Theileria equi* en los hematíes. Una condición indispensable para que el diagnóstico de theileriosis mediante extensión de sangre sea eficaz es tener en cuenta que solo se detecta la fase intraeritrocítica del parásito y que la parasitemia suele ir unida a

fiebre. Por ello, la extensión sanguínea como método diagnóstico solo tiene utilidad en animales febriles (Olmeda et al., 2005), si bien no se trata de un sistema práctico a gran escala.

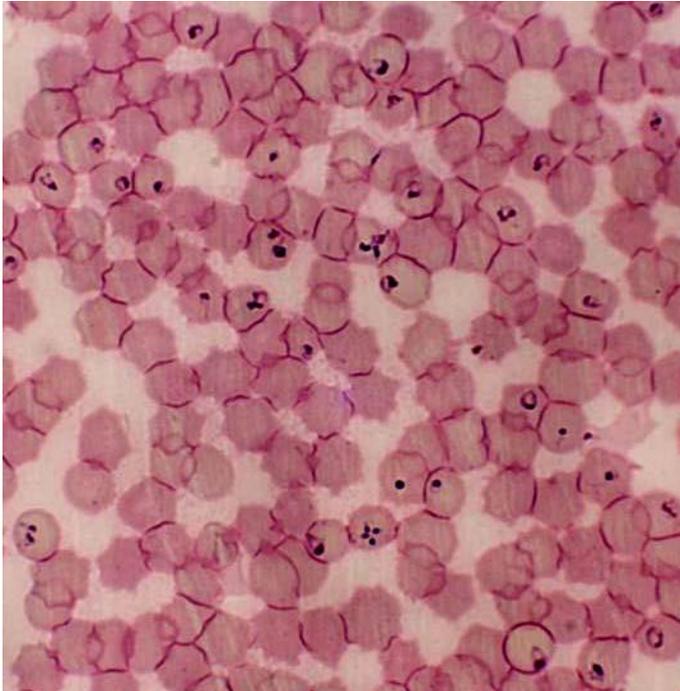


FOTO 1. Muestra de sangre de un caballo con *Theileria equi*

(Imagen cedida por el Dr. Santiago Hernández, Jefe del Departamento de Parasitología Veterinaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, España)

Un frotis de sangre, teñido con Giemsa, Wright's o Diff-Quik®, puede revelar organismos durante la fase aguda de la infección. Los frotis deben ser examinados minuciosamente durante la infección grave, ya que el porcentaje de parasitemia permanece tan bajo que los resultados falsos negativos son comunes (Friedholl y Soule, 1996). Las piroplasmas de *Theileria equi* y *Babesia caballi* pueden diferenciarse fácilmente entre sí. Dentro de los eritrocitos, *Babesia caballi* suele aparecer en formas piriformes, merozoitos que miden aproximadamente 2-5 nm de longitud. Durante la infección clínica con *Babesia caballi*, el porcentaje de eritrocitos parasitados es típicamente inferior al 1%, pudiendo incluso ser menor del 0,1%. Los merozoitos de *Theileria equi* se observan dentro de los

eritrocitos como polimórficos, pequeños piroplasmas, ocasionalmente en una formación cruzada maltesa, denominada típicamente como cruz de malta (Rothschild, 2013).

Los merozoitos de *Theileria equi* son más pequeños y suelen medir 2-3 nm, el porcentaje de eritrocitos infectados durante la enfermedad clínica causada por *Theileria equi* está usualmente entre el 1 y 5%, pero en casos severos puede superar el 20%. En los casos de infección crónica o inaparente, el número de parásitos sigue siendo demasiado bajo para una detección fiable mediante un frotis (Brüning, 1996). Por ello, se han desarrollado varias pruebas serológicas para aumentar la sensibilidad diagnóstica, especialmente en los caballos portadores sin signos clínicos. Estas pruebas incluyen el test de fijación de complemento, CFT (Ogunremi et al., 2007; Kerber et al., 2009; Guidi et al., 2015), ensayo de inmunofluorescencia indirecta, IFAT (Farkas et al., 2013; Piantedosi et al., 2014; Laus et al., 2015; Ferreira et al., 2016), Western blot, y un ELISA de competición, cELISA (Kumar et al., 2013; Hussain et al., 2014; Mahmoud et al., 2016; Sumbria et al., 2016).

Los caballos infectados serán positivos según la técnica CFT aproximadamente en 8-11 días después de la infección, empezando a decrecer la titulación a los 2-3 meses. La prueba CFT es una prueba muy específica, pero carece de sensibilidad, especialmente en infecciones crónicas o tras el tratamiento (Knowles et al., 1992). Los caballos pueden volverse transitoriamente negativos en 3-15 meses después del tratamiento para *Babesia caballi* y en 24 meses para *Theileria equi* (Weiland, 1986).

La inmunoglobulina IgG (T), ahora clasificada como IgG5 y, en menor grado, IgG3, permanece elevada en infecciones crónicas. La IgG (T) no se fija al complemento y se ha demostrado que la IgG3 se fija al complemento, mientras que la IgG5 no (McGuire et al., 1971). Por ello, no es de extrañar que la técnica CFT carezca de sensibilidad para el diagnóstico de infección crónica o no aparente por *Theileria equi*. Se ha descrito reactividad cruzada entre anticuerpos contra *Theileria equi* y *Babesia caballi* cuando se utiliza el CFT (Donnelly et al., 1982). Independientemente del hecho de que el CFT sea una prueba reglamentaria oficial para evaluar en un caballo antes de viajar a un país no

endémico, no se considera la prueba diagnóstica de elección para la infección crónica (OIE, *Equine piroplasmosis terrestrial manual*, 2008).

La técnica IFAT demuestra una alta especificidad, pero carece de sensibilidad, si bien se considera más sensible que el CFT (Brüning, 1996). La infección intravenosa experimental con *Theileria equi* o con *Babesia caballi* dio como resultado IFAT positivo, resultados obtenidos a los días 3-20 después de la infección. Los títulos fueron detectados y se mantuvieron elevados durante más tiempo con el IFAT que con el CFT (Tenter y Friedhoff, 1986). Por lo general, el IFAT se utiliza como un análisis adjunto, para ayudar en la interpretación de los resultados del CFT, pero sigue siendo una de las pruebas de detección de piroplasmosis equina recomendada por la OIE (OIE, *Equine piroplasmosis terrestrial manual* 2008).

El Western blot (o inmunoblot) se ha utilizado principalmente en un entorno de investigación. Desde 2004, la técnica cELISA ha sido una de las pruebas reglamentarias prescritas por la OIE para el transporte de caballos. Se considera la técnica más sensible para la detección de la infección crónica por *Theileria equi*. Los caballos infectados con *Theileria equi* son detectables con cELISA a los 21 días después de la infección experimental y aproximadamente a las 5 semanas después de la transmisión por garrapatas (Knowles et al., 1991). El cELISA está validado para su uso contra múltiples cepas de *Theileria equi* en todo el mundo (Knowles et al., 1992; Jaffer et al., 2010; Kouam et al., 2010; Baptista et al., 2013; Kumar et al., 2013; Rosales et al., 2013; Hussain et al., 2014; Mahmoud et al., 2016; Sumbria et al., 2016).

Se han analizado estadísticamente los diversos datos obtenidos sobre la especificidad y sensibilidad de las técnicas serológicas (Knowles et al., 1991; Katz et al., 2000; Kappmeyer et al., 2009.). En general, la sensibilidad de CFT para detectar *Theileria equi* es del 47% y del cELISA es del 96%. Las especificidades de las 2 pruebas son 94% y 95%, respectivamente (Knowles et al., 1991; Kappmeyer et al., 1999).

En la actualidad, la prueba CFT está desechada del uso diagnóstico individual por su baja sensibilidad y especificidad. La prueba IFAT tiene el inconveniente de la subjetividad

y repetitividad de los resultados (Brüning, 1996). Las pruebas enzimo-inmunológicas (ELISA) han sido mejoradas en los últimos años por anticuerpos recombinantes, siendo las más utilizadas.

La prueba de elección recomendada por la OIE (OIE, 2008) es el cELISA. Si bien las pruebas serológicas son técnicas de elección para la detección de portadores, no tienen eficacia suficiente en el diagnóstico de un cuadro clínico. Este hecho es lógico, si se tiene en cuenta que el periodo de incubación del proceso es de unos 14 días y el organismo necesita un mínimo de 18 días para desarrollar una respuesta inmune detectable. Por tanto, es muy posible que cuando aparezca la sintomatología, la concentración de anticuerpos esté iniciando su elevación (Olmeda et al., 2005). Por otro lado, se ha visto que más de un 40% de la población equina española posee anticuerpos específicos frente a *Theileria equi*. Un incremento en el título de anticuerpos en un infectado crónico puede deberse a reinfecciones, pero también a infecciones concomitantes o a otros procesos debilitantes (Olmeda et al., 2005). En definitiva, la principal aplicación de estas técnicas serológicas es la detección de portadores y de reservorios con aplicación en epidemiología y en el caso de caballos destinados a exportación o donantes de sangre (Olmeda et al., 2005).

Las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del organismo de interés se basan en la amplificación y detección de fracciones específicas del ADN. Esta prueba es muy sensible y hasta ahora se han utilizado tres variantes de PCR para la detección de *Theileria equi*: PCR en tiempo real (Kim et al., 2008; Bhoora et al., 2010; Alanazi et al., 2014; Laus et al., 2015; Bartolomé del Pino et al., 2016), PCR anidada y PCR anidada con hibridación (Butler et al., 2008; Ferreira et al., 2016; Sumbria et al., 2016; Ayala-Valdovinos et al., 2017). La comparación entre estas pruebas y sus resultados son difíciles de estandarizar, dado que no existe ninguna normalización entre laboratorios. La PCR anidada para *Theileria equi*, utilizando la secuencia del gen EMA-1 ha demostrado detectar un resultado positivo equivalente a un porcentaje de parasitemia del 0,000006% (Nicolaiewsky, 2001). También se ha descrito que la PCR anidada detecta 3,69 veces más infecciones que la microscopía y 2,29 veces más que la PCR tradicional (Nicolaiewsky et al., 2001). La validez de la PCR anidada en los Estados Unidos ha sido cuestionada como

herramienta de diagnóstico para caballos provenientes de Sudáfrica (Ueti et al., 2003). Al realizar del examen de la composición genética de la EMA-1 se reconoció que las cepas de todo el mundo no eran homólogas al 100%. Estos descubrimientos cuestionaron la normalización de la técnica PCR como prueba diagnóstica. Es improbable que la PCR anidada llegue a ser estandarizada y comercializada para la detección de infección por *Theileria equi* o *Babesia caballi* (Yang y Rothman, 2004).

Con el uso más extendido de la PCR en entornos de laboratorio, se ha cuestionado la validez de un resultado positivo de cELISA. Tras el tratamiento en infecciones por *Theileria equi* que previamente habían sido diagnosticados con cELISA, el animal se encuentra libre del parásito como demuestra un resultado negativo de PCR. Sin embargo los resultados de cELISA siguen siendo positivos hasta 24 meses después. El riesgo de transmisión que representarían estos animales PCR negativo, seropositivos a cELISA no se ha definido aún.

En cuanto a la aplicación de estos métodos moleculares para la detección de casos crónicos y portadores, la PCR no es demasiado eficaz, ni tampoco fiable, ya que se basan en la detección del parásito en sangre (Jaffer et al., 2010).

Datos recientes indican también que cELISA, en combinación con la PCR, es un excelente indicador de la eliminación de la infección después del tratamiento con dipropionato de imidocarb en caballos infectados de forma natural (Ueti et al., 2012).

6.5. TRATAMIENTO Y CONTROL DE LA THEILERIOSIS EQUINA

En regiones endémicas, el tratamiento de la piroplasmosis es sólo un procedimiento para disminuir la severidad de los signos clínicos y reducir el número de muertes. La eliminación completa del organismo no tiene ningún propósito en estos casos, ya que confiere inmunidad a lo largo de toda la vida (premunidad). Por el contrario, en regiones no endémicas, es decir que permanecen libres de piroplasmosis, el tratamiento de los caballos infectados, además de disminuir la sintomatología clínica, tiene la intención de

liquidación del parásito (quimioesterilización), siendo éste último efecto el más deseado. Las infecciones por *Theileria equi* son más difíciles de tratar que las infecciones por *Babesia caballi* (Frerichs y Holbrook, 1973). Se han estudiado numerosos fármacos, que han demostrado tener una eficacia variable en la inhibición de *Theileria equi* y *Babesia caballi*, tanto en células de cultivo, como in vivo.

Si bien se ha descrito un aclaramiento quimioterapéutico completo de *Theileria equi* en caballos, estas investigaciones se han llevado a cabo antes del desarrollo de pruebas diagnósticas suficientemente sensibles como para detectar la persistencia del parásito (Frerichs et al., 1974). Hasta hace poco tiempo, se aceptaba que la quimioesterilización de un caballo positivo a *Theileria equi* era un logro inalcanzable.

Actualmente, no existe ningún tratamiento que tenga una eficacia completa, de modo que los productos farmacológicos solo consiguen una mejoría clínica. Los más eficaces son la buparvaquona y la parvaquona, aunque su uso no está permitido en nuestro país. Una alternativa es la administración de compuestos babesicidas, como el dipropionato de imidocarb, con una utilidad dudosa, limitada y variable según los autores (Kumar et al., 2003; Vial y Gorenflot, 2006; Butler et al., 2008; Grause et al., 2013). Algunos estudios recientes apoyan aún más el uso de este fármaco como una opción de tratamiento potencial para el control de brotes de infección (Grause et al., 2013). Por lo tanto, la búsqueda de nuevos fármacos con bajo efecto tóxico para los animales es necesaria.

Los datos recogidos durante el brote en Texas han indicaron que *Theileria equi* puede ser eliminado de un caballo infectado con una dosificación apropiada de dipropionato de imidocarb (Ueti et al., 2012). Para el alivio de los signos clínicos, se han utilizado varios fármacos con éxito, si bien el imidocarb, en su forma de sal de dipropionato, se considera el más eficaz. Una forma alternativa de este fármaco, compuesto de sal de dihidrocloruro, parece que puede causar un daño muscular más severo en el sitio de inyección (Bork et al., 2003; Meyer et al., 2005). El dipropionato, es un derivado de carbanilida, y se administra en el caballo por vía intramuscular (IM). Aunque su mecanismo de acción no está claro, se ha sugerido que inhibe la entrada de inositol a los

eritrocitos infectados o altera el metabolismo de las poliaminas (Bacchi et al., 1981; McHardy et al., 1986).

Las dosis para el control de la intensidad de la sintomatología es variable, si bien algunas fuentes indican que dosis de 2,2-4,4 mg/kg IM una vez son eficaces. Si es necesario, se pueden repetir dosis más bajas a intervalos de 24-72 h durante 2-3 tratamientos. En países no endémicos, en los que el objetivo del tratamiento es la eliminación quimioterapéutica del organismo, los animales infectados con *Babesia caballi* pueden ser eliminado con una dosis de 4,4 mg/kg IM cada 72 h durante 4 tratamientos (Schwint et al., 2009). Para la eliminación de *Theileria equi*, los datos obtenidos tanto en infecciones naturales como experimentales, indican que esta misma dosis, 4,4 mg/kg, es efectiva (Ueti et al., 2012). De los 25 caballos tratados e infectados naturalmente por Ueti et al. (2012), se obtuvieron serologías positivas para *Theileria equi* después del tratamiento inicial y tuvieron que someterse a un segundo régimen de tratamiento para obtener la quimioesterilización.

Actualmente, el aclaramiento del parásito se determina mediante resultados de PCR negativos y mediante la incapacidad de transmitir el parásito a un caballo esplectomizado a través de transfusiones de sangre, pero existen investigaciones en curso para definir más claramente la eliminación de parásitos. En los Estados Unidos, si un caballo es diagnosticado con *Theileria equi*, el propietario y el veterinario tienen que introducir al caballo en el programa de tratamiento controlado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), para garantizar la cuarentena, el tratamiento y la liberación de caballos limpios del parásito (Grause et al., 2013).

El dipropionato de imidocarb (Imizol®) a una dosis de 4 mg/kg IM administrado en cuatro dosis separadas 72 h es usualmente un tratamiento eficaz para los signos clínicos de la infección por *Theileria equi* (Grause et al., 2013). Este régimen de tratamiento también ha tenido éxito en la esterilización completa de algunos casos. El dipropionato tiene actividad anticolinesterasa, por lo que la administración del fármaco a menudo conlleva numerosos síntomas colaterales, tales como sudoración, agitación, cólico y diarrea (Adams, 1981; Meyer et al., 2005). Generalmente se trata de síntomas transitorios, que

raramente amenazan la vida del paciente. Los efectos se pueden prevenir mediante la administración previa de una dosis intravenosa (IV) de glicopirolato a 0,0025 mg/kg una vez. Igualmente, los síntomas desaparecieron con una sola dosis IV de atropina a 0,2 mg/kg. No obstante, hay que tener en cuenta que ambos fármacos anticolinérgicos también pueden desencadenar efectos adversos. La administración de escopolamina puede aminorar dichos efectos adversos. Como el dipropionato sufre eliminación hepática y renal, puede provocar enfermedad hepática periportal y necrosis tubular renal (Adams, 1981; Meyer et al., 2005). Por tanto, los caballos sometidos a este tratamiento deben estar en estrecha vigilancia para impedir el desarrollo de complicaciones.

Laboratorialmente, la administración de dipropionato puede producir azotemia transitoria, elevaciones en la actividad μ -glutamil transferasa (GGT), creatinina o de ambas, así como transitorias elevaciones en las actividades enzimáticas hepáticas (aspartato aminotransferasa AST, alanina aminotransferasa ALT, fosfatasa alcalina ALP y sorbitol deshidrogenasa SDH) durante el tratamiento, pero normalmente se resuelven con la interrupción de la administración del fármaco. Los burros y las mulas son mucho sensibles por lo que su uso de este fármaco en estas especies no está recomendado. La información sobre la administración del dipropionato de imidocarb en potros neonatos infectados por *Theileria equi* se restringe a un único caso (Silvey, 1996). En yeguas lactantes, una única dosis de 2,4 mg/kg IM, hace que el fármaco sea detectable en leche 2 h después de la administración, si bien no se ha demostrado si esto podría tener efectos tóxicos sobre el potro lactante. Un informe de administración de dipropionato a yeguas gestantes a las que se les provocó el aborto, describió concentraciones similares en sangre materna y fetal (Lewis et al., 1999).

Otros compuestos antiprotozoarios, como el aceturato de diminazene y el diaceturato de diminazene también se han utilizado con éxito contra *Theileria equi* y *Babesia caballi* a dosis de 3,5 mg / kg IM cada 48 horas en 2 tratamientos (Rashid et al., 2008). El aceturato es más eficaz que el diaceturato, si bien ambos fármacos parecen causar un daño muscular significativo en el punto de inyección. La eficacia de ambos fármacos

aumenta con la segunda dosis. Los signos de toxicidad incluyen dificultad respiratoria y letargo (Rashid et al., 2008).

El antibiótico oxitetraciclina cuando se administra IV, a una dosis de 5-6 mg/kg, una vez al día, durante 7 días es eficaz contra *Theileria equi*, pero no contra *Babesia caballi* (Zobba et al., 2008). Otros fármacos de los cuales se ha evaluado su eficacia en la babesiosis son, el isocianato de amicarbilade, la euflavina, el artesunato y arteether (derivados de la artemisia), la buparvaquona y atovaquona. Sin embargo estos fármacos ya no son comúnmente utilizados en la práctica clínica (Kumar et al., 2003). El ponazuril inhibe a organismos de *Theileria equi* in vitro (Wise et al., 2012). En conocimiento de los autores, no se ha demostrado la eficacia de estos fármacos en animales vivos, si bien en el futuro, podrían representar opciones adicionales de tratamiento en el caballo.

Aparte de los fármacos antiprotozoarios, las infecciones agudas en los caballos, a menudo requieren de cuidados de apoyo incluyendo la administración de fluidos IV, antiinflamatorios no esteroideos, manejo del dolor y transfusiones de sangre. La hidratación adecuada es esencial durante la iniciación al tratamiento con imidocarb. La enoxacina, antibacteriano de amplio espectro, también se ha probado recientemente y se ha demostrado que posee una potente acción inhibitoria de los parásitos de los géneros *Babesia* y *Theileria* (Omar et al., 2016).

Los eritrocitos infectados por el parásito generan especies reactivas de oxígeno (ROS) durante su ciclo de vida asexual eritrocítica (Griffiths et al., 2001) y los eritrocitos infectados son muy susceptibles al estrés oxidativo (Becker et al., 2003). Por ello la búsqueda de nuevos tratamientos se centra en el estudio de las moléculas diana sobre las cuales actuar.

Desde un punto de vista epidemiológico, los esfuerzos tendrían que ir encaminados a intentar que nunca se rompiera el equilibrio parásito-hospedador. Conociendo que la premunidad confiere protección frente a reinfecciones, es importante asegurar que el estado inmunitario de los caballos sea adecuado y que las infecciones por garrapatas se mantuvieran dentro de unos límites normales para una explotación (Olmeda et al., 2005).

El control epidemiológico de los animales destinados a la exportación es muy complejo. Habría que desarrollar un sistema de aislamiento que impidiera que el caballo entrara en contacto con la garrapata. El gran inconveniente de este hecho es que, cualquier fallo conllevaría a una primoinfección, con unas consecuencias desastrosas para el caballo (Steel, 2000; Olmeda et al., 2005).

La prevención de la infección en las naciones endémicas es prácticamente imposible, y se supone que la premunidad con la infección inicial actúa para proteger al caballo de la enfermedad recurrente en exposiciones posteriores. En naciones no endémicas, la piedra angular de la protección es la regulación del movimiento equino entre naciones. Dependiendo del país no endémico, los caballos deben ser negativos para *Theileria equi* y *Babesia caballi* en la prueba serológica específicamente designada por el país de importación, normalmente cELISA. Si es positivo, generalmente se rechaza la entrada a los caballos, a menos que existan acontecimientos atléticos, los cuales estarán regulados firmemente. Todos los caballos importados de naciones endémicas se pondrán en cuarentena y se examinarán detenidamente en búsqueda de garrapatas. Se procederá a la aplicación de acaricidas antes del embarque a la nación endémica, para garantizar que las garrapatas no se han introducido junto con los caballos. El sistema regulador en vigor por parte de la OIE ha sido exitoso, aunque se siguen produciendo algunos casos aislados en países no endémicos. Estos casos aislados, raramente son causados por la transmisión por garrapatas y están a menudo vinculados al uso de sangre contaminada en los equipos y prácticas que implican compartir agujas o transfusiones de sangre de donantes no controlados (Short et al., 2012). En Estados Unidos, un caballo que se identifica como positivo a cELISA, debe ser inmediatamente puesto en cuarentena y las autoridades estatales y federales deben ser informadas del suceso de manera inmediata. Hasta que se identifiquen mediante métodos fiables de esterilización, estos caballos deben permanecer en cuarentena, ser exportados, donados a centros de investigación o eutanasiados. La acción más apropiada viene determinada por las autoridades reguladoras estatales y federales, caso por caso (Grause et al., 2013).

Las naciones no endémicas que bordean a naciones endémicas no pueden prevenir completamente la introducción de garrapatas, por lo que deben implementarse medidas para reducir el contacto de los caballos con este vector. Esto incluye la aplicación rutinaria de acaricidas, vigilancia de la presencia de garrapatas y reducción de la vegetación. Existen numerosos productos disponibles para reducir la exposición a la garrapata, pero no todos los acaricidas cumplen con los reglamentos de la EPA (*“United States Department of Agriculture Animal and Plant Inspection Service”*). Aunque no existen evidencias científicas directas en caballos, la administración sistémica del antiparasitario ivermectina, probablemente ayude en el control de las garrapatas (EPA, 2013).

Se ha investigado el uso potencial de la vacunación para inducir la inmunidad a *Babesia caballi* y *Theileria equi*. Sin embargo, ninguna vacuna está comercialmente disponible. La inmunización con merozoitos indujo protección en 4 burros (Kumar et al., 2003). No se dispone de datos sobre la protección en caballos, y hasta que esto se pueda dilucidar, el desarrollo de una vacuna eficaz será difícil.

Las estrategias de vacunación y tratamiento dependen sobretodo del estado de la infección (endémica versus no endémica) y de la región. El desarrollo de una vacuna que prevenga la transmisión o enfermedad clínica y la muerte es importante para aquellos caballos que se han trasladado a regiones endémicas. Actualmente existen quimioterapéuticos, que ayudan en el control de la parasitemia aguda y signos clínicos asociados, como se ha descrito en este mismo apartado, pero no eliminan la infección, si bien son muy útiles en regiones endémicas. En regiones no endémicas, el objetivo es mantenerse libres de infección. Por tanto, cuando se detectan caballos infectados, los compuestos quimioterapéuticos no son eficaces para eliminar la infección. Para permanecer libre de infecciones, es necesario un mayor desarrollo de herramientas exactas de diagnóstico y un conocimiento profundo de las poblaciones de garrapatas y de su capacidad de transmisión de *Babesia caballi* y *Theileria equi*.

El aumento de la globalización de la industria equina, con climas en constante cambio, constituye un auténtico desafío para el control de las infecciones persistentes causadas por *Theileria equi* y *Babesia caballi*. A través de la vigilancia de las poblaciones

equinas y con un conocimiento detallado de la competencia y hábitat del vector, se puede reducir la infección. La información precisa sobre los ciclos de vida, transmisión, respuestas inmunes, diagnósticos fiables y tratamiento de estos parásitos es primordial para que estas enfermedades insidiosas no se extiendan, al tiempo que el movimiento internacional de caballos crece continuamente.



7. DESCRIPCIÓN DE LOS TRES ESTUDIOS INCLUIDOS EN LA TESIS

La presente Tesis Doctoral se ha dividido en tres estudios.

En el **ESTUDIO I**, se realizará una descripción clínica y laboratorial de caballos Pura Raza Española (PRE) afectados por *Theileria equi*, pertenecientes a una misma ganadería de una zona endémica. Para ello, se han seleccionado dos grupos de animales, con síntomas compatibles con theileriosis, que fueron sometidos a un diagnóstico laboratorial (técnica PCR). Solo se han introducido en este primer estudio animales con resultados PCR positivos a *Theileria equi* y negativos a otras enfermedades transmitidas por garrapatas, incluyendo *Babesia caballi* y *Anaplasma phagocytophilum*. Los animales se dividieron en dos grupos. Uno de ellos, estuvo formado por hembras, que permanecían en pastoreo, debido a su función reproductiva, y el segundo, estuvo formado por machos, que estaban en entrenamiento y/o se usaban como reproductores. La diferenciación entre grupos se llevó a cabo porque este segundo grupo permanecía en estabulación.

Como grupo control, se seleccionaron animales sanos, sin síntomas clínicos y PCR negativo, igualmente divididos en dos grupos, hembras en pastoreo y machos en estabulación.

Se compararon estos 4 grupos en cuanto a sintomatología y parámetros laboratoriales. Concretamente, se analizaron estos parámetros: eritrograma completo (número de glóbulos rojos GR, concentración de hemoglobina HB, valor hematócrito HTO, volumen corpuscular medio VCM, hemoglobina corpuscular media HCM, concentración de hemoglobina corpuscular media CHCM) y leucograma (número total de glóbulos blancos GB, número de neutrófilos NEU, linfocitos LINF, monocitos MON). Además, se realizó un perfil de coagulación, que integraba el número de plaquetas (PLT), el tiempo de protrombina (TPT) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPPT), para evaluar las vías de coagulación extrínseca, intrínseca y común. En cuanto a la bioquímica sérica, se determinaron las concentraciones de bilirrubina total (BIL), urea (BUN), creatinina (CREAT), proteínas plasmáticas totales (PPT), albúmina (ALB), calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg) y actividades enzimáticas creatín kinasa (CK), aspartato aminotransferasa (AST), lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (ALP) y γ -

glutamil transferasa (GGT), para evaluar la presencia de lesión y/o disfunción hepática, renal y muscular.

Como uno de los objetivos planteados en este primer trabajo era analizar la posible respuesta de fase aguda al agente parasitario, se cuantificaron las concentraciones de 4 proteínas de fase aguda, el amiloide sérico A (SAA), proteína C reactiva (CRP), haptoglobina (Hp) y fibrinógeno (FIB). Finalmente, para concluir este primer estudio, también midieron las concentraciones de algunos marcadores de metabolismo férrico, que además podrían actuar como reactantes de fase aguda, tales como el hierro (Fe), ferritina (FERR) y la capacidad de unión al hierro no saturado (UIBC).

En el **ESTUDIO II**, se expondrán los resultados de las encuestas enviadas a veterinarios clínicos de Andalucía. En dichas encuestas, se ha solicitado a diversos clínicos de équidos que completen, de forma individual para cada paciente, datos relativos al animal (raza, sexo, edad, uso del animal...) y a las condiciones ambientales (temperatura, humedad, momento del año, en estabulación o en pastoreo...), en el momento en el que se efectuó el diagnóstico. Además, se ha preguntado acerca de los síntomas más comunes, ya que quizás, al tratarse de una muestra más heterogénea de caballos en comparación con la presentada en el estudio I, se podría encontrar una mayor variabilidad sintomatológica. Por otro lado, los servicios de estos veterinarios fueron requeridos por los propietarios, de modo que es lógico suponer, que fueron de intensidad superior a la encontrada en el estudio I. De igual modo, hemos querido conocer en este segundo estudio los métodos analíticos que se utilizan de forma más frecuente para el diagnóstico de esta enfermedad en la clínica de campo e igualmente, los tratamientos que se eligen rutinariamente.

Finalmente, en el **ESTUDIO III**, se describen tres casos clínicos, de tres caballos de raid, que empezaron competiciones sobre diferentes distancias, comprendidas entre 80 y 160 km, sobre las cuales competían regularmente. En los tres casos, los animales estaban bien entrenados y superaron el examen veterinario inicial, desarrollando síntomas de rabdomiólisis al inicio de la competición. Tras ser retirados de la misma, se detectó anemia los días siguientes, y en los tres casos, se encontró un resultado PCR positivo a *Theileria equi*. Con este tercer estudio, queremos destacar la importancia del estrés, asociado al

ejercicio, competición, transporte... en el desarrollo de síntomas compatibles con theileriosis, en animales que posiblemente sean portadores crónicos. En este caso, la theileriosis puede surgir en cualquier momento del año, no teniendo por qué aparecer asociada a la presencia de garrapatas.



8. BIBLIOGRAFÍA

- ABEDI V, RAZMI G, SEIFI H. (2015). Molecular detection of equine piroplasms in donkeys (*Equus asinus*) in North Khorasan province, Iran. Iran J Vet Res. 2:202-204.
- ABUTARBUSH SM, ALQAWASMEH DM, MUKBEL RM, AL-MAJALI AM. (2012). Equine babesiosis: seroprevalence, risk factors and comparison of different diagnostic methods in Jordan. Transbound Emerg Dis. 59(1):72-78.
- ADAMS LG. (1981). Clinicopathological aspects of imidocarb dipropionate toxicity in horses. Res Vet Sci. 31(1):54-61.
- ADASZEK T, GARCÍA-BOCANEGRA I, ARENAS-MONTES A, CARBONERO A, ARENAS A, WINIARCZYK S. (2012). Identification of piroplasms isolated from asymptomatic equine species from southern Spain. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 125(11-12):509-512.
- ALANAZI AD, SAID AE, MORIN-ADELIN V, ALYOUSIF MS, SLAPETA J. (2014). Quantitative PCR detection of *Theileria equi* using laboratory workflows to detect asymptomatic persistently infected horses. Vet Parasitol. 206(3-4):138-145.
- ALLSOPP MT, ALLSOPP BA. (2006). Molecular sequence evidence for the reclassification of some Babesia species. Acad Sci. 1081:509-517.
- ALLSOPP MT, CAVALIER-SMITH T, DE WAAL DT, ALLSOPP BA. (1994). Phylogeny and evolution of the piroplasms. Parasitology. 108:147-152.
- ALLSOPP MT, LEWIS BD, PENZHORN BL. (2007). Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. Vet Parasitol. 148:130-136.
- ASGARALI Z, COOMBS DK, MOHAMMED F, CAMPBELL MD, CAESAR E. (2007). A serological study of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Thoroughbreds in Trinidad. Vet Parasitol. 144(1-2):167-171.
- 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* horses in western Mexico by nested PCR. Parasitol Intern. 66(1):821-824.
- BACCHI CJ, NATHAN HC, HUTNER SH, DUCH DS, NICHOL CA. (1981). Prevention by polyamines of the curative effect of amicarbalide and imidocarb for *Trypanosoma brucei* infections in mice. Biochem Pharmacol. 30:883-886.
- BALDANI CD, HILARIO E, NAKAGHI AC, BERTOLINI MC, MACHADO RZ. (2011). Production of recombinant EMA-1 protein and its application for the diagnosis of *Theileria equi* using an enzyme immunoassay in horses from São Paulo State, Brazil. Res Bras Parasitol Vet. 20(1):54-60.

- BAPTISTA C, LOPES MS, TAVARES AC, ROJER H, KAPPEMEYER L, MENDONC D, MACHADO ADC. (2013). Diagnosis of *Theileria equi* infections in horses in the Azores using cELISA and nested PCR. Ticks Tick Borne Dis. 4:242-245.
- BARTOLOMÉ DEL PINO LE, NARDINI R, VENEZIANO V. (2016). *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in central-Southern Italy: sero-molecular survey and associated risk factors. J Parasitology. 462-469.
- BATTSETSEG B, LUCERO S, XUAN X, CLAVERIA FG, INOUS N, ALHASSAN A, KANNO T, IGARASHI I, NAGASAWA H, MIKAMI T, FUJISAKI K. (2002). Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. Vet Parasitol. 107(4):351-357.
- BECKER K, TILLEY L, VENNERSTROM JL, ROBERTS D, ROGERSON S, GINSBURG H. (2003). Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host parasite interactions. Int J Parasitol. 34:163-189.
- BHAGWAN J, KUMAR A, KUMAR R, GOYAL L, GOEL P, KUMAR S. (2015). Molecular evidence of *Theileria equi* infection in *Hyalomma anatolicum* ticks infested on seropositive Indian horses. Acta Parasitol. 60 (2):322-329.
- BHOORA R, BUSS P, GUTHRIE AJ, PENZHORN BL, COLLINS NE. (2010). Genetic diversity of piroplasms in plains zebra (*Equus quagga burchellii*) and Cape mountain zebra (*Equus zebra zebra*) in South Africa. Vet Parasitol. 174(1-2):145-149.
- BORK S, YOKOYAMA N, MATSUO T, CLAVERIA FG, FUJISAKI K, IGARASHI I. (2003). Growth inhibitory effect of triclosan on equine and bovine *Babesia* parasites. Am J Trop Med Hyg. 68:334-340.
- BRÜNING A. (1996). Equine piroplasmiasis an update on diagnosis, treatment and prevention. Br Vet J. 152:139-151.
- BUTLER C. (2013). Can *Theileria equi* be eliminated from carrier horses?. Vet J. 196(3):279.
- BUTLER CM, SLOET VAN, OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN MM, STOUT TA, VAN DER KOLK JH, WOLLENBERG LV, NIELEN 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. Vet J. 193(2):381-385.
- BUTLER CM, NIJHOF AM, VAN DER KOLK JH, DE HASETH OB, TAOUFIK A, JONGEJAN F, HOUWERS DJ. (2008). Repeated high dose imidocarb dipropionate treatment did not eliminate *Babesia caballi* from naturally infected horses as determined by PCR-reverse line blot hybridization. Vet Parasitol. 151(2-4):320-322.

- CAMACHO AT, GUITIAN FJ, PALLAS E, GESTAL JJ, OLMEDA AS, HABELA MA, TELFORDRD SR, SPIELMAN A. (2005). *Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain. Trop Anim Health Prod. 37:293-302.
- 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. J Parasitol. 98(4):869-870.
- CASTEEL SW, TURK JR. (2002). Collapse/sudden death. En: Smith BP, editor. Large animal internal medicine. St. Louis, MO: Mosby.
- CHHABRA S, RANJAN R, UPPAL S, SINGLA LD. (2012). Transplacental transmission of *Babesia equi (Theileria equi)* from carrier mares to foals. J Parasit Dis. 36:31-33.
- COLETO L. (1999). Equine babesiosis: a disease linked to the extensive horse raising in the pasture land of Extremadura (“dehesa”). Cahiers Opt. Med. 39; 305-315.
- DE WAAL DT, VAN HEERDEN J. (2004). Equine piroplasmiasis. En: Coetzer JAW, Tustin RC, eds. Infectious diseases of livestock, 2nd ed. Cape Town, South Africa: Oxford University Press, pp. 425-433.
- DE WAAL DT, VAN HEERDEN J, VAN DEN BERG SS, STEGMANN GF, POTGIETER FT. (1988). Isolation of pure *Babesia equi* and *Babesia caballi* organisms in splenectomized horses from endemic areas in South Africa. Onderstepoort J Vet Res. 55:33-35.
- DE WAAL DT. (1992). Equine piroplasmiasis: a review. Br Vet J. 148:6-14.
- DONNELLY J, PHIPPS LP, WATKINS KL. (1982). Evidence of maternal antibodies to *Babesia equi* and *B caballi* in foals of seropositive mares. Equine Vet J. 14:126-128.
- EPA. (2013). United States Department of Agriculture Animal and Plant Inspection Service. Equine piroplasmiasis. Updated November 2012. http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/piroplasmiasis.
- ESTRADA-PENA A, GUGLIELMONE AA, MANGOLD AJ. (2004). The distribution and ecological ‘preferences’ of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. Ann Trop Med Parasitol. 98:283-292.
- EUZEBY J, KASSAI T, CORDERO DEL CAMPILLO M. (1988). Standardized nomenclature of animal parasitic diseases. Vet Parasitol. 4:299-326.
- FARKAS R, TÁNCZOS B, GYURKOVSKY M, FÖLDVÁRI G, SOLYMOSI N, EDELHOFER R, HORNOK S. (2013). Serological and molecular detection of *Theileria equi* infection in horses in Hungary. Vet Parasitol. 192(1-3):143-148.

- FERREIRA EP, VIDOTTO O, ALMEIDA JC, RIBEIRO LP, BORGES MV, PEQUENO WH, STIPP DT, DE OLIVEIRA CJ, BIONDO AW, VIEIRA TS, VIEIRA RF. (2016). Serological and molecular detection of *Theileria equi* in sport horses of northeastern Brazil. *Immunol Microbiol.* 47:72-76.
- FERROLHO J, ANTUNES S, SANTOS ASVELEZ R, PADRE L, CABEZAS-CRUZ A, SANTOS-SILVA MM, DOMINGOS A. (2016). Detection and phylogenetic characterization of *Theileria* spp. and *Anaplasma marginale* in *Rhipicephalus bursa* in Portugal. *Ticks tick Borne Dis.* 7(3):443-448.
- FRERICHS WM, ALLEN PC, HOLBROOK AA. (1973). Equine piroplasmiasis (*Babesia equi*): Therapeutic trials of imidocarb dihydrochloride in horses and donkeys. *Vet Rec.* 93:73-75.
- FRERICHS WM, HOLBROOK AA. (1974). Treatment of equine piroplasmiasis (*B. caballi*) with imidocarb dipropionate. *Vet Rec.* 95:188-189.
- FRIEDHOFF KT, SOULE C. (1996). An account on equine babesioses. *Rev Sci Tech.* 15:1191-1201.
- FRIEDHOFF KT, TENTER AM, MULLER I. (1990). Haemoparasites of equines: Impact on international trade of horses. *Rev Sci.* 9:1187-1194.
- 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(2):172-178.
- GEORGES KC, EZEOKOLI CD, SPARAGANO O, PARGASS I, CAMPBELL M, D'ABADIE R, YABSLEY MJ. (2011). Case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. *Vet Parasitol.* 175:363-366.
- GERSTENBERG C, ALLEN WR, PHIPPS LP. (1999). Mechanical transmission of *Babesia equi* infection in a British herd of horses. En: *Equine infectious diseases VIII. Proceedings of the 8th International Conference* (Wernery U, Wade JF, Mumford JA, Kaaden OR, Eds.). Newmarket UK, R & W Publications, pp. 217-222.
- GRANDI G, MOLINARI G, TITTARELLI M, SASSERA D, KRAMER LH. (2011). Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses from northern Italy. *Vector Borne Zoonot.* 11(7):955-956.
- GRAUSE JF, UETI MW, NELSON JT, KNOWLES DP, KAPPMAYER LS, BUNN TO. (2013). Efficacy of imidocarb dipropionate in eliminating *Theileria equi* from experimentally infected horses. *Vet J.* 196:541-546.
- GRIFFITHS MJ, NDUNGU F, BAIRD KL, MULLER DP, MARSH K, NEWTON CR. (2001). Oxidative stress and erythrocytes damage in Kenyan children with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Br J Haematol.* 113:486-491.

- GUIDI G, PRADIER S, LEBERT I, LEBLOND A. (2015). Piroplasmosis in an endemic area: analysis of the risk factors and their implications in the control of theileriosis and babesiosis in horses. *Parasitol Res.* 114(1):71-83.
- GUIMARAES AM, LIMA JD, RIBEIRO MF. (1998). Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. *Parasitol Res.* 84(4):323-327.
- 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 Parasitol.* 62(1):207-213.
- HABELA M, ROL JA, ANTÓN JM, PEÑA J, CORCHERO E, VAN HAM I, JONGEJAN E. (1999). Epidemiology of Mediterranean theileriosis in Extremadura region, Spain. *Parassitologia.* 41 Suppl 1:47-51.
- HAWKINS E, KOCK R, MCKEEVER D, GAKUYA F, MUSYOKI C, CHEGE SM, MUTINDA M, KARIUKI E, DAVIDSON Z, LOW B, SKILTON RA, NJAHIRA MN, WAMALWA M, MAINA E. (2015). Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* as well as the identification of associated ticks in sympatric Grevy's zebras (*Equus grevyi*) and donkeys (*Equus africanus asinus*) in northern Kenya. *J Wild Dis.* 51(1):137-147.
- HEIM A, PASSOS LF, RIBEIRO MB, COSTA-JUNIOR L, BASTOS C, CABRAL D, HIRZMANN J, PFISTER K. (2007). Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. *Parasitol Res.* 102:63-68.
- HIKOSAKA K, WATANABE Y, TSUJI N, KITA K, KISHINE H, ARISUE N, PALACPAC NM, KAWAZU S, SAWAI H, HORII T, IGARASHI I, TANABE K. (2010). Divergence of the mitochondrial genome structure in the Apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. *Mol Biol Evol.* (5):1107-1116.
- HOLBROOK AA, FRERICHS WM. (1968). Equine piroplasmosis. *Proceedings of the Annual Meeting of the United States Animal Health Association*; 72:220e22.
- 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. *Vet Parasitol.* 202(3-4):248-256.
- IKADAI H, SASAKI M, ISHINA H, MATSUU A, IGARASHI I, FUJISAKI K, OYAMADA T. (2007). Molecular evidence of *Babesia equi* transmission in *Haemaphysalis longicornis*. *Am J Trop Med Hyg.* 76:694-697.
- IORI A, GABRIELLI S, CALDERINI P, MORETTI A, PIETROBELLI M, TAMPIERI MP, GALUPPI R, CANCRINI G. (2010). Tick reservoirs for piroplasms in central and northern Italy. *Vet Parasitol.* 170(3-4):291-296.

- 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 piroplasmosis. *Parasitol Res.* 106(3):709-713.
- JONGEJAN F, RUNGENIER M, PUTTING M, BERGER L, BURGERS S, KORTEKAAS R, LENSSEN J, VAN ROESSEL M, WIJNVELD M, MADDER M. (2015). Novel foci of *Dermacentor reticulatus* ticks infected with *Babesia canis* and *Babesia caballi* in the Netherlands and in Belgium. *Parasit Vector.* 8:232.
- KAPPMAYER LS, PERRYMAN LE, HINES SA, BASZLER TV, KATZ JB, HENNAGER SG, KNOWLES DP. (1999). Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* by recombinant *B. caballi* rhoptry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 37:2285-2290.
- KAPPMAYER LS, THIAGARAJAN M, HERNDON DR, RAMSAY JD, CALER E, DJIKENG A, GILLESPIE JJ, LAU AO, ROALSON EH, SILVA JC, SILVA MG, SUAREZ CE. (2012). Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*. *BMC Genomics.* 9(13):603 .
- KATZ J, DEWALD R, NICHOLSON J. (2000). Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia equi*, *Babesia caballi*, *Trypanosoma equiperdum*, and *Burkholderia mallei* infection in horses. *J Vet Diagn Invest.* 12:46-50.
- KERBER CE, LABRUNA MB, FERREIRA F, DE WAAL DT, KNOWLES DP, GENNARI SM. (2009). Prevalence of equine piroplasmosis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 18(4):1-8.
- KIM CM, BLANCO LB, ALPHASSAN 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(2-4):158-163.
- KNOWLES DP JR, PERRYMAN LE, KAPPMAYER LS, HENNAGER SG. (1991). Detection of equine antibody to *Babesia equi* merozoite proteins by a monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 29(9):2056-2058.
- KNOWLES DP JR, KAPPMAYER LS, STILLER D, HENNAGER SG, PERRYMAN LE. (1992). Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi*. *J Clin Microbiol.* 30(12):3122-3126.
- 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. *Vet Parasitol.* 169(3-4):273-278.
- KUMAR S, GUPTA AK, PAL Y, DWIVEDI SK. (2003). In-vivo therapeutic efficacy trial with

- artemisinin derivative, buparvaquone and imidocarb dipropionate against *Babesia equi* infection in donkeys. *J Vet Med Sci.* 65(11):1171-1177.
- KUMAR S, KUMAR R, GUPTA AK, YADAV SC, GOYAL SK, KHURANA SK, SINGH RK. (2013). Development of EMA-2 recombinant antigen based enzyme-linked immunosorbent assay for seroprevalence studies of *Theileria equi* infection in Indian equine population. *Vet Parasitol.* 198(1-2):10-17.
- KUTTLER KL. (1988). Worldwide impact of babesiosis. En: *Babesiosis of domestic animals and man* (Ristic M, Ed.). CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, USA, pp. 1-22.
- LAUS F, SPATERNA A, FAILLACE V, VERONESI F, RAVAGNAN S, BERIBÉ F, CERQUETELLA M, MELIGRANA M, TESEI B. (2015). Clinical investigation in *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Italian donkeys. *BMC Vet Res.* 11:100. Doi:10.1186/s12917-015-0411-7
- LAVERAN A. (1901). Contribution to the study of equi Piroplasma. *CR Seances Soc Biol Paris* 53:385-386.
- LEWIS BD, PENZHORN BL, VOLKMANN DH. (1999). Could treatment of pregnant mares prevent abortions due to equine piroplasmosis. *J S Afr Vet Assoc.* 70:90-91.
- LIU Q, MELI ML, ZHANG Y, MEILI T, STIRN M, RIOND B, WEIBEL B, HOFMANN-LEHMANN R. (2016). Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene in *Theileria equi* from horses presented in Switzerland. *Vet Parasitol.* 221:24-29.
- MACHADO RZ, TOLEDO CZ, TEIXEIRA MC, ANDRÉ MR, FRESCHI CR, SAMPAIO PH. (2012). Molecular and serological detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in donkeys (*Equus asinus*) in Brazil. *Vet Parasitol.* 186 (3-4):461-465.
- MAHMOUD MS, EL-EZZ NT, ABDEL-SHAFY S, NASSAR SA, EL NAMAKY AH, KHALIL WK, KNOWLES D, KAPPMAYER L, SILVA MG, SUAREZ CE. (2016). Assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in equine populations in Egypt by molecular, serological and hematological approaches. *Parasit Vectors.* 4(9):260.
- MAHONEY DF, WRIGHT IG, FRERICHS WM, GROENENDYK S, O'SULLIVAN BM, ROBERTS MC, WADDELL AH. (1977). The identification of *Babesia equi* in Australia. *Aust Vet J.* 53(10):461-464.
- MCGUIRE TC, VAN HOOSIER GL JR, HENSON JB. (1971). The complement-fixation reaction in equine infectious anemia: demonstration of inhibition by IgG (T). *J Immunol.* 107(6):1738-1744.
- MCHARDY N, WOOLLON RM, CLAMPITT RB, JAMES JA, CRAWLEY RJ. (1986). Efficacy, toxicity and metabolism of imidocarb dipropionate in the treatment of *Babesia ovis* infection in sheep. *Res Vet Sci.* 41:14-20.

- MEHLHORN H, SCHEIN E. (1984). The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Adv Parasitology*. 23, 37e103.
- MEHLHORN H, SCHEIN E. (1998). Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein. *Parasitol Res*. 84:467-475.
- METCALF ES. (2001). The role of international transport of equine semen on disease transmission. *Anim Reprod Sci*. 68:229-237.
- MEYER C, GUTHRIE AJ, STEVENS KB. (2005). Clinical and clinicopathological changes in 6 healthy ponies following intramuscular administration of multiple doses of imidocarb dipropionate. *J S Afr Vet Assoc*. 76:26–32
- MOLTMANN UG, MEHLHORN H, SCHEIN E, REHBEIN G, VOIGT WP, ZWEYGARTH E. (1983). Fine structure of *Babesia equi* Laveran, 1901 within lymphocytes and erythrocytes of horses: An in vivo and in vitro study. *J Parasitol*. 69:111-120.
- MORETTI A, MANGIL A, 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. *Vet J*. 184(3):346-350.
- MUJICA FF, PERRONE T, FORLANO M, CORONADO A, MELÉNDEZ RD, BARRIOS N, ALVAREZ R, GRANDA F. (2011). Serological prevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses of Lara State, Venezuela. *Vet Parasitol*. 178(1-2):180-183.
- NICOLAIEWSKY TB, RICHTER MF, LUNGE VR, CUNHA CW, DELAGOSTIN O, IKUTA N, FONSECA AS, DA SILVA SS, OZAKI LS. (2001). Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. *Vet Parasitol*. 101:9-21.
- NUTALL GH, STRICKLAND C. (1910). Die parasiten der pferdepiroplasmose response der biliary fever. *Zentralbl Bakteriol*. 1:2.
- ODUORI DO, ONYANGO SC, KIMARI JN, MACLEOD ET. (2015). A field survey for the seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in donkeys from Nuu Division, Kenya. *Tick Born Dis*. 6(5):683-688.
- OGUNREMI O, GEORGIADIS MP, HALBERT G, BENJAMIN J, PFISTER K, LOPEZ-REBOLLAR L. (2007). Validation of the indirect fluorescent antibody and the complement fixation tests for the diagnosis of *Theileria equi*. *Vet Parasitol*. 148(2):102-108.
- OIE. (2008) Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE (World Organization for Animal Health), from http://www.oie.int/Eng/Normes/Mmanual/2008/pdf/2.0_5.08_EQUINE_PIROPLASMOSIS.pdf
- OLIVEIRA MR, KREIER JP. (1979). Transmission of *Babesia microti* using various species of ticks as vectors. *J Parasitol*. 65:816-817.

- OLMEDA AS, VALCÁRCEL F, CAMACHO AT, DÍEZ E, MEANA A. (2005). Theileriosis equina. *Equinus*. 13, 41-49
- OMAR MA, SALAMA A, ELSIFY A, RIZK MA, AL-ABOODY MS, ABOULAILA M, EL-SAYED SA, IGARASHI I. (2016). Evaluation of in vitro inhibitory effect of enoxacin on *Babesia* and *Theileria* parasites. *Exp Parasitol*. 161:62-67.
- PHIPPS LP, OTTER A. (2004). Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. *Vet Rec*. 154:406-408.
- PIANTEDOSI D, D'ALESSIO N, DI LORIA A, DI PRISCO F, MARIANI U, NEOLA B, SANTORO M, MONTAGNARO S, CAPELLI G, VENEZIANO V. (2014). Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in donkeys from Southern Italy. *Vet J*. 202(3):578-582.
- PITEL P-H, PRONOST S, SCRIVE T, LÉON A, RICHARD E, FORTIER G. (2010). Molecular detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in the bone marrow of asymptomatic horses. *Vet Parasitol*. 170:182-184.
- POSADA-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. *Vet Med Int*. 236278.
- QABLAN MA, OBORNÍK 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.
- RAMSAY JD, UETI MW, JOHNSON WC, SCOLES GA, KNOWLES DP, MEALEY RH. (2013). Lymphocytes and macrophages are infected by *Theileria equi*, but T cells and B cells are not required to establish infection in vivo. *PLoS One*. 7;8(10):e76996.
- RASHID H, CHAUDHRY M, RASHID H, PERVEZ K, KHAN MA, MAHMOOD AK. (2008). Comparative efficacy of diminazene diacetate and diminazene aceturate for the treatment of babesiosis in horses. *Trop Anim Health Prod*. 40:463-467.
- 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. *Parasitol Res*. 112(7):2611-2617.
- ROBERT N, WALZER C, RÜEGG SR, KACZENSKY P, GANBAATAR O, STAUFFER C. (2005). Pathologic findings in reintroduced Przewalski's horses (*Equus caballus przewalskii*) in southwestern Mongolia. *J Zoo Wild Med*. 36(2):273-285.
- ROSALES R, RANGEL-RIVAS A, ESCALONA A, JORDAN LS, GONZATTI MI, ASO 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. *Vet Parasitol.* 196(1-2):37-43.

ROS-GARCÍA A, M'GHIRBI Y, HURTADO A, BOUATTOUR A. (2013). Prevalence and genetic diversity of piroplasm species in horses and ticks from Tunisia. *Infect Genet Evol.* 17:33-37.

ROTHSCHILD CM. (2013). Equine piroplasmosis. *J Equine Vet Sci.* 3:497-508.

RUDZINSKA M, SPIELMAN A, LEWENGRUB S, PIESMAN J, KARAKASHIAN S. (1984). The sequence of developmental events of *Babesia microti* in the gut of *Ixodes dammini*. *Protistologica.* 20:649-663.

SALIM B, BAKHEIT MA, KAMAU J, NAKAMURA I, SUGIMOTO C. (2010). Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene within *Theileria equi* from horses in Sudan. *Parasitol Res.* 106(2):493-498.

SALIM BO, HASSAM 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. *Parasitol Res.* 103(5):00436-008-1108.

SANTOS TM, MACHADO RZ, BALDANI CD, ALMEIDA FQ, MORAES LM, 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. *Rev Bras Parasitol Vet.* 20(3):235-241.

SCHEIN E, REHBEIN G, VOIGT WP, ZWEYGARTH E. (1981). *Babesia equi* (Laveran 1901) 1. Development in horses and in lymphocyte culture. *Tropenmed Parasitol.* 32:223-227.

SCHEIN E. (1988). Equine babesiosis. En: *Babesiosis of domestic animals and man.* Ristic M, Ed. Boca Raton, FL: CRC, pp. 197-208.

SCHWINT ON, UETI MW, PALMER GH, KAPPMAYER LS, HINES MT, CORDES RT, KNOWLES DP, SCOLES GA. (2009). Imidocarb dipropionate clears persistent *Babesia caballi* infection with elimination of transmission potential. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(10):4327-4332.

SCOLES GA, HUTCHESON HJ, SCHLATER JL, HENNAGER SG, PELZEL AM, KNOWLES DP. (2011). Equine piroplasmosis associated with *Amblyomma cajennense* ticks, Texas, USA. *Emerg Infect Dis.* 17:1903-1905.

SCOLES GA, UETI MW. (2013). *Amblyomma cajennense* is an intrastadial biological vector of *Theileria equi*. *Parasit Vectors.* 6(1):306.

SCOLES GA, UETI MW. (2015). Vector ecology of equine piroplasmosis. *Ann Rev Entomol.* 60:561-580.

SHORT MA, CLARK CK, HARVEY JW, WENZLOW N, HAWKINS IK, ALLRED DR, KNOWLES DP, CORN JL, GRAUSE JF,

- HENNAGER SG, KITCHEN DL, TRAUB-DARGATZ JL. (2012). Outbreak of equine piroplasmosis in Florida. J Am Vet Med Assoc. 240:588-595.
- SIGG L, GERBER V, GOTTSTEIN B, DOHERR MG, FREY CF. (2010). Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in the Swiss horse population. Parasitol Int. 59(3):313-317.
- SIGRIST B. (1983). Übertragung von *Babesia equi* durch *Hyalomma anatolicum anatolicum* und *Rhipicephalus turanicus*. Inaugural Dissertation, Hannover 59.
- SILVEY RE. (1996). Babesiosis in a foal. Vet Rec. 139(17):428.
- SLIVINSKA K, VÍCHOVÁ B, WERSZKO J, SZEWCZYK T, WRÓBLEWSKI Z, PEŤKO B, RAGAČ O, DEMESHKANT V, KARBOWIAK G. (2016). Molecular surveillance of *Theileria equi* and *Anaplasma phagocytophilum* infections in horses from Ukraine, Poland and Slovakia. Vet Parasitol. 215:35-37.
- SONENSHINE DE. (1991). Biology of ticks. New York, NY: Oxford University Press.
- STEEL RJ. (2000). Temporary importation of *Babesia* and *Ehrlichia* seropositive horses into Australia. Aust. Vet. J. 78(7), 469.
- STEINMAN A, ZIMMERMAN T, KLEMENT E, LENSKY IM, BERLIN D, GOTTLIEB Y, BANETHG. (2012). Demographic and environmental risk factors for infection by *Theileria equi* in 590 horses in Israel. Vet Parasitol. 187:558-562.
- SUDAN V, JAISWAL AK, SRIVASTAVA A, SAXENA A, SHANKER D. (2015). A rare clinical presentation of transplacental transmission and subsequent abortion by *Babesia (Theileria) equi* in a mare. J Parasit Dis. 39(2):336-338.
- SUMBRIA D, DAS SINGLA L, SHARMA A. (2016). *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection of equids in Punjab, India: a serological and molecular survey. Trop Animal Health Prod. 48(1):45-52.
- TAYLOR WM, BBRYANT JE, ANDERSON JB, WILLERS KH. (1969). Equine piroplasmosis in the United States--a review. J Am Vet Med Assoc. 155(6):915-9.
- TENTER AM, FRIEDHOFF KT. (1986). Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. Vet Parasitol. 20:49-61.
- TORINA A, VICENTE J, ALONGI A, SCIMECA S, TURLÁ R, NICOSIA S, DI MARCO V, CARACAPPA S, DE LA FUENTE J. (2007). Observed prevalence of tick-borne pathogens in domestic animals in Sicily, Italy during 2003-2005. Zoonos Publish Health. 54(1):8-15.
- UETI MW, MEALEY RH, KAPPMAYER LS, WHITE SN, KUMPULA-MCWHIRTER N, PELZEL AM, GRAUSE JF, BUNN TO, SCHWARTZ A, TRAUB-DARGATZ JL,

- HENDRICKSON A, ESPY B, GUTHRIE AJ, FOWLER WK, KNOWLES DP. (2012). Re-emergence of the apicomplexan *Theileria equi* in the United States: elimination of persistent infection and transmission risk. *PLoS One*. 7(9):e44713.
- UETI MW, PALMER GH, KAPPMAYER 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.
- UETI MW, PALMER GH, SCOLES GA, KAPPMAYER LS, KNOWLES DP. (2008). Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the apicomplexan parasite *Babesia equi*. *Infect Immun*. 76:3525–3529.
- UETI MW, PALMER H, KAPPMAYER LS, STATDFIELD M, SCOLES GA, KNOWLES DP. (2005). Ability of the vector tick *Boophilus microplus* to acquire and transmit *Babesia equi* following feeding on chronically infected horses with low-level parasitemia. *J Clin Microbiol*. 43:3755–3759.
- UILENBERG G. (1986). Studies in the field of tick-borne blood parasites. *Tijdschr Diergeneeskd*. 112(20):1163-1171.
- VAN VUUREN M, PENZHORN BL. (2015). Geographic range of vector-borne infections and their vectors: the role of African wildlife. *Rev Sci Tech*. 34(1):139-149.
- VIAL HJ, GORENFLOT A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Vet Parasitol*. 138(1-2):147-160.
- WEILAND G. (1986). Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Vet Parasitol*. 20(1-3):43-48.
- WENYON CM. (1926). Protozoology. En: A Manual for medical men, veterinarians and zoologists, vol. II, Hafner Publish. Co., New York, p. 986 (Reprinted in 1965).
- WISE LN, KAPPMAYER LS, MEALEY RH, KNOWLES DP. (2013). Review of equine piroplasmosis. *J Vet Intern Med*. 27:1334-1346.
- WISE LN, PETZEL-MCCLUSKWKY AM, MEALEY RH, KNOWLES DP. (2014). Equine piroplasmosis. *Vet Clin North Am: Equine Pract*. 30(3):677-693.
- WISE LN, UETI MW, KAPPMAYER LS, HINES MT, WHITE SN, DAVIS W, KNOWLES DP. (2012). In vitro activity of ponazuril against *Theileria equi*. *Vet Parasitol*. 185:282-285.
- YANG S, ROTHMAN RE. (2004). PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute care settings. *Lancet Infect Dis*. 4:337-348.
- ZOBBA R, ARDU M, NICCOLINI S. (2008). Clinical and laboratory findings in equine piroplasmosis. *J Equine Vet Sci*. 28:301-308.



9. ESTUDIO I

**Características Clínicas y Laboratoriales,
incluyendo Proteínas de Fase Aguda, en
Caballos Pura Raza Española positivos a
*Theileria equi***

9.1. INTRODUCCIÓN

La mayor parte de los trabajos científicos disponibles sobre piroplasmosis equina, llevan a cabo análisis de prevalencia en diversos países y áreas, fundamentalmente, usando métodos serológicos y en los últimos años, PCR. Las investigaciones más recientes han descrito la prevalencia en países cercanos a España, como Italia (Moretti et al., 2010; Grandi et al., 2011; Piantedosi et al., 2014; Laus et al., 2015; Bartolomé del Pino et al., 2016), Francia (Fritz, 2010), Suiza (Sigg et al., 2010) o Grecia (Kouam et al., 2010). También en España se han llevado a cabo diversos estudios epidemiológicos (Habela et al., 1989; García-Bocanegra et al., 2013).

A pesar de estas numerosas publicaciones, los resultados deben ser interpretados con precaución, debido a las intensas diferencias en el diseño experimental, la población estudiada y las pruebas diagnósticas. Particularmente importante es el uso previo de la prueba CFT para la detección de anticuerpos contra *Babesia caballi* o *Theileria equi*. Los datos sobre este tema, han confirmado que el CFT carece de sensibilidad en la detección de infecciones persistentes (McGuire et al., 1971; Weiland, 1986; Brüning, 1996).

Por otro lado, la información sobre las características clínicas y laboratoriales de esta enfermedad es mucho más limitada en nuestro país, quedando restringida a dos artículos, uno publicado por Camacho et al. (2005), donde se evalúa la hematología y bioquímica sérica en caballos seropositivos y clínicamente afectados por la enfermedad frente a un grupo control y un segundo artículo publicado por Barrera et al. (2010), en donde se describe el patrón electroforético sérico en caballos afectados por *Babesia caballi* y/o *Theileria equi*. También hay que tener en cuenta que la sintomatología en zonas endémicas es menos evidente, debido a la inmunización de los animales frente a estos parásitos.

9.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.

El **OBJETIVO GENERAL** de este trabajo es realizar una caracterización clínica y laboratorial en caballos Pura Raza Española (PRE) positivos a *Theileria equi*, pertenecientes a una ganadería de una zona endémica (provincia de Córdoba, España). Además, en los últimos años, se le ha otorgado una gran importancia en medicina veterinaria, con aplicaciones clínicas y pronósticas a las proteínas de fase aguda (*'acute phase proteins'*, APPs), como marcadores de la respuesta inflamatoria subyacente al proceso. En conocimiento de los autores, hasta la actualidad, no se ha cuantificado la respuesta de fase aguda en caballos afectados por estos parásitos.

Este objetivo general se divide en los siguientes objetivos específicos:

Primer objetivo. Conocer la sintomatología asociada a la infección por *Theileria equi* en zonas endémicas, en caballos PRE.

Segundo objetivo. Definir las principales alteraciones hematológicas y bioquímicas que experimentan estos caballos.

Tercer objetivo. Valorar si existen diferencias clínico-laboratoriales entre caballos estabulados y en pastoreo, con diferentes probabilidades de contacto con el vector.

Cuarto objetivo. Analizar si se produce una respuesta de fase aguda a la infección por *Theileria equi* en caballos de zonas endémicas y valorar si, la intensidad de dicha respuesta está correlacionada con la sintomatología y con el resto de parámetros laboratoriales cuantificados.

Como **HIPÓTESIS DE PARTIDA** para esta investigación, proponemos las siguientes:

Primera hipótesis. Que los caballos positivos a *Theileria equi*, pertenecientes a zonas endémicas, mostrarán sintomatología y cambios laboratoriales de intensidad leve, debido a su estado inmunitario y contactos continuos con el parásito.

Segunda hipótesis. Que los caballos que permanecen en estabulación, mostrarán síntomas y alteraciones laboratoriales menos evidentes que aquellos que permanecen en pastoreo, debido a un riesgo de contacto superior con el vector.

Tercera hipótesis. Que los caballos con sintomatología más leve presentarán una respuesta inflamatoria de menos intensidad, y esta circunstancia se hará patente en las concentraciones de las proteínas de fase aguda.

9.3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

9.3.1. Caracterización clínica de la theileriosis equina

El periodo de incubación de la infección por *Theileria equi* es de unos 12 a 19 días aproximadamente (De Waal et al., 1987), mientras que el periodo de incubación de la infección por *Babesia caballi* es de 10 a 30 días (De Waal, 1990). Los signos clínicos a menudo son inespecíficos, y la enfermedad se puede confundir con otras condiciones hemolíticas similares que cursen con fiebre, anemia e ictericia (Zobba et al., 2008; Butler et al., 2012; Rothschild, 2013; Wise et al., 2013; 2014). Las principales enfermedades que se deben considerar en el diagnóstico diferencial son: anemia infecciosa equina, arteritis equina, peste equina, erlichiosis o anaplasmosis equina y púrpura hemorrágica (Zobba et al., 2008; Paladino et al., 2016). Por lo general, *Theileria equi* suele causar una enfermedad más grave que *Babesia caballi* (Camacho et al., 2005).

Los signos clínicos más frecuentes suelen ser fiebre, anemia, ictericia, y hemoglobinuria y a veces, muerte. Además *Theileria equi* puede provocar infecciones intrauterinas dando lugar a aborto y muerte neonatal (Potgieter et al., 1992; Lewis et al., 1999; Phipps y Otter, 2004; Kumar et al., 2008; Chhabra et al., 2012). En algunos casos, la mortalidad aguda o crónica de la enfermedad puede alcanzar hasta un 50% (De Waal, 1992).

Los signos clínicos son menos evidentes en animales de zonas endémicas, debido a que presentan anticuerpos que les hacen ser más resistentes a la enfermedad. Los animales infectados que se recuperan de una infección aguda o primaria de *Theileria equi* pueden ser portadores de por vida (De Waal y Van Heerden, 1994).

La enfermedad clínica puede manifestarse en diferentes formas, peraguda, aguda, crónica e inaparente. La forma peraguda cursa con una sintomatología súbita y fulminante, con colapso y muerte súbita, pudiendo aparecer en aquellos animales que no han tenido un contacto previo con el parásito, tras llegar a una zona endémica. En los años 30, la relocalización de caballos procedentes de zonas libres de la enfermedad en zonas

endémicas (concretamente en el sur de Francia), dio lugar a una alta tasa de mortalidad (69%) (Basset y Auger, 1931). Durante este tipo de infección, los parásitos se replican en los eritrocitos, condicionando hemólisis y muerte secundaria a anemia (Casteel y Turk, 2002; Rothschild, 2013; Wise et al., 2013). También se ha descrito esta forma peraguda en animales previsiblemente portadores inaparentes que experimentaron un recrudecimiento del proceso tras un ejercicio intenso (Hailat et al., 1997).

La forma aguda de la infección, que es el curso más común, se presenta con síntomas no específicos, como fiebre, que puede superar los 40°C, disminución del apetito, pérdida de peso y edemas periféricos (Tamzali, 2013; Rothschild, 2013; Wise et al., 2013; 2014). Pueden observarse petequias en las membranas mucosas, incluyendo membrana nictitante, causadas por la trombocitopenia (Camacho et al., 2005). Es frecuente encontrar síntomas asociados a anemia hemolítica, tales como mucosas pálidas o ictéricas, taquicardia, taquipnea, debilidad y pigmenturia, debido a hemoglobinuria o bilirrubinuria (Ambawat et al., 1999; Camacho et al., 2005; Zobba et al., 2008; Tasaki et al., 2013; Rothschild, 2013; Wise et al., 2013; 2014). Algunos caballos presentan síntomas de complicaciones gastrointestinales, incluyendo cólico o impactaciones seguidas de diarrea (Wise et al., 2013). Otras manifestaciones clínicas menos frecuentes incluyen el desarrollo secundario de neumonía, edema pulmonar, arritmias cardíacas, enteritis catarral, laminitis y afectación del sistema nervioso central, con ataxia, mialgia y convulsiones (De Waal y Van Heerden, 2004; Diana et al., 2007; Zobba et al., 2008; Rothschild, 2013; Wise et al., 2013; 2014). Se han descrito casos de infertilidad permanente en sementales (Donnellan y Marais, 2009). De forma secundaria a la nefropatía pigmentaria, y a la hipotensión derivada de una respuesta sistémica a la inflamación, se puede producir una insuficiencia renal aguda (Zobba et al., 2008; Tamzali, 2013; Rothschild, 2013; Wise et al., 2013; 2014). Las infecciones severas pueden culminar en insuficiencia hepática o en coagulación intravascular diseminada (CID) (Diana et al., 2007; Zobba et al., 2008; Donnellan y Marais, 2009; Wise et al., 2013; Sumbria et al., 2016).

Se puede detectar esplenomegalia mediante palpación rectal o con ultrasonografía. Se ha sugerido que la esplenomegalia está causada por el aumento de la tasa de hemólisis

extravascular, que se produce en el interior de los sinusoides esplénicos en caballos menos afectados (Allen et al., 1975; Camacho et al., 2005; Zobba et al., 2008; Rothschild, 2013; Tamzali, 2013; Wise et al., 2013).

La forma crónica o subclínica es similar a la anterior, si bien se acompaña de pérdida de peso y fiebre intermitente. Las mucosas pueden aparecer anémicas o ictéricas, a veces con petequias y equimosis. Los movimientos intestinales se reducen y los caballos pueden mostrar signos leves de cólico (Phipps, 1996). Los casos crónicos suelen cursar con síntomas muy inespecíficos, tales como inapetencia leve, disminución del rendimiento físico y pérdida de masa corporal (Hailat et al., 1997; Camacho et al., 2005).

Es importante considerar que los caballos infectados por *Theileria equi*, tanto de zonas endémicas como no endémicas, pueden ser portadores inaparentes, sin síntomas apreciables de enfermedad (Knowles, 1988; Zobba et al., 2008; Mujica et al., 2011; Tamzali, 2013; Wise et al., 2013; Laus et al., 2015). La gestación en hembras portadoras puede dar lugar a aborto o infecciones neonatales (Allsopp et al., 2007). La babesiosis neonatal en los potros se caracteriza por debilidad en el nacimiento, apatía y desarrollo de anemia e ictericia severa (Erbslöh, 1975). Los potros afectados se vuelven progresivamente letárgicos y en última instancia, son incapaces de ponerse de ponerse o permanecer en la estación o de amamantarse. Suele haber fiebre y se pueden apreciar petequias en las mucosas (Phipps y Otter, 2004; Georges et al., 2011; Chhabra et al., 2012).

En los caballos infectados con *Babesia caballi*, el organismo puede quedar limpio del parásito a los 12- 48 meses postinfección de forma espontánea. Sin embargo en las infecciones por *Theileria equi* esto no sucede (Bashiruddin et al., 1999.)

La aparente variación global en la enfermedad clínica puede venir dada por diversos factores que determinan la emergencia de la infección y la severidad del proceso. La infección con *Theileria equi* en Sudáfrica a menudo resulta en enfermedad grave que suele requerir una intervención médica (Viljoen et al., 2009). En contraste, en el brote de los Estados Unidos, en los cuales 475 caballos se vieron afectados, sólo se informó que 1 caballo presentaba síntomas clínicos leves (Ueti et al., 2007).

La respuesta del sistema inmune equino a la infección con *Theileria equi* o *Babesia caballi* no está completamente definida, ya que es un proceso complejo y multifacético. Se acepta que la infección con cualquiera de estos dos parásitos tiene como resultado la adquisición del estatus de portador, que confiere protección contra la enfermedad (Uilenberg, 2006; Rothschild, 2013; Silva et al., 2013). No se ha documentado protección cruzada entre *Theileria equi* y *Babesia caballi*, y por tanto, los caballos pueden estar infectados con ambos parásitos simultáneamente (Rothschild, 2013).

El bazo desempeña un papel necesario en el control de la mayoría de los parásitos hemoprotozoarios. Un caballo con un bazo sano es capaz de superar la enfermedad aguda inducida por *Theileria equi*, mientras que los caballos esplenectomizados invariablemente sucumben a la enfermedad con parasitemias que pueden alcanzar el 80% (Kuttler et al., 1986; Ambawat et al., 1999; Wise et al., 2013). Los portadores inaparentes de *Theileria equi* también desarrollarán la enfermedad tras la esplenectomía (Wise et al., 2013; 2014).

9.3.2. Hallazgos hematológicos en caballos infectados por *Theileria equi*

La anemia, tanto intravascular como extravascular, caracterizada por un descenso del número de eritrocitos (GR), concentración de hemoglobina (HB) y valor hematócrito (HTO) es un hallazgo laboratorial común en caballos con theileriosis (Ambawat et al., 1999; Camacho et al., 2005; Zobba et al., 2008; Rothschild, 2003; Sumbria et al., 2016). Generalmente, la reducción del HTO es moderada, raramente decrece por debajo del 10%, si bien en algunos casos puede ser muy severa, con valores inferiores al 10%. La anemia severa es más común en infecciones por *Theileria equi* que por *Babesia caballi* (Ambawat et al., 1999; Rothschild, 2013). Algunos autores han documentado un incremento de la hemoglobina corpuscular media (HCM) (Laus et al., 2015; Sumbria et al., 2016), si bien las alteraciones en los índices eritrocitarios es variable (Ambawat et al., 1999). La anemia también se observa laboratorialmente en burros, a pesar de permanecer asintomáticos y con parasitemias muy bajas en comparación con los caballos (Gizachew et al., 2013; Laus et al., 2015).

La patogenia de la anemia se ha estudiado intensamente en perros con babesiosis (Rudzinska et al., 1983; Murase y Maede, 1990; Jacobson y Clark, 1994; Lobetti, 2005; Taboada y Lobetti, 2006). En general, se considera que es una anemia hemolítica, que se asocia a un incremento de BIL (De Waal et al., 1987; Camacho et al., 2005; Zobba et al., 2008; Rothschild, 2013; Wise et al., 2013; Laus et al., 2015; Sumbria et al., 2016). No obstante, en casos crónicos, la anemia es leve y no se acompaña de hiperbilirrubinemia (Taylor et al., 1968). Las teorías patogénicas propuestas en perros con *Babesia canis* son numerosas. En primer lugar, la parasitemia da lugar a eritrocitos osmóticamente frágiles (Rudzinska et al., 1983). Además, se produce una lesión física de la membrana tras la fisión binaria intraeritrocitaria de los trofozoitos (Zygner et al., 2007). Sin embargo, la severidad de la anemia no es proporcional a la parasitemia, por lo que deben intervenir otros mecanismos o factores que conlleven a la destrucción de los hematíes, y no solo de aquellos que se encuentran parasitados (Murase y Maede, 1990; Jacobson y Clark, 1994; Taboada y Lobetti, 2006). En segundo lugar, la presencia de antígenos en la membrana de los eritrocitos infectados desencadena una respuesta defensiva en el hospedador, con opsonización de hematíes y fagocitosis posterior en el sistema monocítico mononuclear (Murase y Maede, 1990). La hiperplasia de dicho sistema origina esplenomegalia, consecuencia que ha sido descrita como síntoma clínico anteriormente (epígrafe 9.3.1.). Mediante este mecanismo, también se destruyen eritrocitos no parasitados (Murase y Maede, 1990; Jacobson y Clark, 1994; Taboada y Lobetti, 2006). En tercer lugar, la activación del sistema calicreína por las proteasas solubles del parásito induce la síntesis de proteínas similares al fibrinógeno (FLP, '*fibrinogen-like protein*'), dando lugar a rigidez eritrocitaria, con dificultad en la deformación de los hematíes al pasar por los capilares. Este mecanismo se cree que contribuye a la anemia aguda. El cerebro y la musculatura son las regiones más afectadas (Lobetti, 2005; Taboada y Lobetti, 2006). En perros, este fenómeno es el desencadenante de la babesiosis cerebral, con síntomas neurológicos (Lobetti, 2005; Adaszek et al., 2012; Daste et al., 2013). En cuarto lugar, la destrucción de los eritrocitos parasitados y no parasitados mediada por el sistema del complemento, es un mecanismo a considerar (Jacobson y Clark, 1994; Taboada y Lobetti, 2006). En quinto lugar, los parásitos pueden producir un factor hemolítico, que altere el sistema

hematopoyético (Zygner et al., 2007; Sumbria et al., 2016). Finalmente, el estrés oxidativo es una causa importante de lesión en la membrana del hematíe en la babesiosis canina (Chaudhuri et al., 2008; Ciftci et al., 2014).

En el caballo, hasta la actualidad y en conocimiento de los autores, de las teorías patogénicas anteriores, solo se ha demostrado la anemia hemolítica y la implicación del estrés oxidativo (Deger et al., 2009; Gopalakrishnan et al., 2016; Radakovic et al., 2016). Así, Deger et al. (2009) detectaron un aumento marcado de malondialdehído y nitratos y una reducción intensa de la enzima glutatión plasmática y vitamina E en caballos y mulas infectados por *Theileria equi*. Estas modificaciones resultaron en cambios en la fragilidad osmótica y en lesión directa sobre las proteínas y lípidos (peroxidación lipídica) de la membrana del eritrocito (Deger et al., 2009; Radakovic et al., 2016). Además, el incremento de la producción de radicales libres de oxígeno altera el ADN celular y este hecho recientemente ha sido implicado en el daño hepatocelular causado por *Theileria equi* (Radakovic et al., 2016).

El leucograma en caballos con *Theileria equi* es variable, dependiente del estado de la infección y de su severidad. En infecciones agudas, se ha descrito neutropenia, con eosinopenia y monocitosis iniciales, seguida de linfocitosis (Roberts et al., 1962; Rothschild y Knowles, 2007; Zobba et al., 2008; Rothschild, 2013; Tamzali, 2013). Por el contrario, en burros se ha descrito una neutrofilia inicial (Kumar et al., 2009). También en burros, Laus et al. (2015) encontraron neutrofilia, pero solo en aquellos animales que eran PCR o IFAT positivos.

La trombocitopenia es un hallazgo laboratorial común en la piroplasmosis equina, así como en otras infecciones protozoarias (Camacho et al., 2005; Zobba et al., 2008; Rothschild, 2013; Tamzali, 2013; Laus et al., 2015). Se ha observado trombocitopenia en caballos infectados por *Theileria equi* de forma natural (Zobba et al., 2008), experimental (De Waal et al., 1987) y en burros (Laus et al., 2015). Se han descrito reducciones en el número de plaquetas de un 39% de los caballos infectados por *Theileria equi*, en un 80% de los caballos infectados por *Babesia caballi* y en un 100% de los caballos con infecciones duales (Allen et al., 1975; De Waal et al., 1987; Camacho et al., 2005).

La patogenia de la trombocitopenia no está clara, si bien se ha estudiado con más profundidad en perros con babesiosis. Se acepta que la trombocitopenia se asocia a una respuesta inflamatoria aguda, con producción de fibrinógeno. Esta proteína se une al receptor GPII/IIIa de las plaquetas, desencadenando agregación plaquetaria y activación de la coagulación sanguínea (Rafaj et al., 2009; Schetters et al., 2009). Además, el incremento en las concentraciones de calicreína plasmática activa el factor de la coagulación XII (Schetters et al., 2009). La activación sostenida de la cascada de la coagulación a consecuencia de la inflamación desencadena una coagulopatía por consumo, con un incremento en el tiempo de coagulación y tendencia a hemorragias (Ruiz de Gopegui et al., 2007; Solano-Gallego et al., 2008; Schetters et al., 2009; Goddard et al., 2013). Otros posibles mecanismos implicados en la trombocitopenia son el secuestro esplénico y la destrucción inmunomediada (Ruiz de Gopegui et al., 2007; Schetters et al., 2009).

No hemos encontrado ninguna investigación sobre las alteraciones laboratoriales de la coagulación en caballos con *Theileria equi*. No obstante, la trombocitopenia se ha implicado, junto con la respuesta de fase aguda, en la patogénesis de diversos síntomas de la piroplasmosis equina, tales como petequias (daño endotelial, aumento de la permeabilidad vascular) y en casos graves, coagulación intravascular diseminada (CID), hemorragias, edemas periféricos y disfunción orgánica (Rothschild, 2013).

9.3.3. Hallazgos laboratoriales bioquímicos en caballos infectados por *Theileria equi*

La hiperbilirrubemia es un hallazgo laboratorial común, clínicamente manifiesta en forma de ictericia. Se puede observar tanto en caballos infectados por *Theileria equi* (Camacho et al., 2005; Zobba et al., 2008; Rothschild, 2013; Tamzali, 2013; Wise et al., 2013; 2014), como en burros (Laus et al., 2015). No obstante, en casos crónicos, la BIL total puede estar dentro de los límites normales.

Las enzimas hepáticas, AST (aspartato aminotransferasa), LDH (lactato deshidrogenasa), GGT (γ -glutamyl transferasa) pueden estar elevadas en caballos infectados por *Theileria equi*. Diversos autores han asociado la elevación de estas enzimas con degeneración centrilobular y necrosis hepática (Camacho et al., 2005; Rothschild, 2013; Tamzali, 2013; Wise et al., 2013; 2014; Sumbria et al., 2016), si bien también hay que tener en cuenta que las enzimas AST y LDH aumentan en hemólisis intravascular (Camacho et al., 2005; Radakovic et al., 2016). No obstante, autores como Zobba et al. (2008) describen una baja incidencia de alteraciones laboratoriales compatibles con lesión hepática en caballos con piroplasmosis. Así, de 26 caballos estudiados (18 positivos a *Theileria equi*, 4 positivos a *Babesia caballi* y 4 positivos a ambos parásitos), sólo un caballo mostró alteraciones significativas en las enzimas hepáticas (Zobba et al., 2008).

Los cambios en la concentración de proteínas plasmáticas totales (PPT), y de sus fracciones, varían según los autores y el estado general del paciente. Camacho et al. (2005) no encontraron diferencias significativas en PPT al comparar caballos seropositivos y seronegativos a *Theileria equi* y a *Babesia caballi*. En general, se acepta que la concentración de albúmina (ALB) puede estar dentro de los límites normales, estar aumentada o reducida, en función de la duración del proceso, del estado hídrico del paciente y de la presencia o ausencia de condiciones asociadas que cursen con pérdida de proteínas (Allen et al., 1975; Rothschild y Knowles, 2007; Tamzali, 2013; Wise et al., 2013). Puede aparecer hiperproteinemia cuando se produce deshidratación debido a la letargia y a una menor ingestión de comida y agua (Barrera et al., 2010). Por el contrario, la hipoproteinemia se ha asociado a enfermedad crónica, debido a fiebre, síntomas asociados a ella y anorexia (Barrera et al., 2010). De los 26 caballos con piroplasmosis, analizados por Zobba et al. (2008), 7 presentaron hipoalbuminemia (4 con *Theileria equi*, 1 con *Babesia caballi* y 2 con infección dual). En cuanto a la concentración de fibrinógeno (FIB), puede aparecer reducida en caso de lesiones hepáticas terminales, consecuencia que no es frecuente en caballos infectados por *Theileria equi* o en presencia de CID. Sin embargo, es más común que el FIB no varíe o bien aparezca una hiperfibrinogenemia derivada de la respuesta sistémica a la inflamación (Tamzali et al., 2001; Tamzali, 2013; Wise et al., 2013).

Se ha analizado el patrón electroforético sérico de caballos con piroplasmosis (Barrera et al., 2010). Estos autores encontraron un incremento de las fracciones de las α_2 -globulinas y de las γ -globulinas. El aumento de las α -globulinas es un hallazgo laboratorial común en caballos con diversas patologías (Karatepe et al., 2009). Aunque este aumento se suele asociar a lesión tisular e inflamación, puede haber un incremento de la fracción α en caballos con patologías no asociadas a inflamación, tales como lesión hepática y renal (Hoffman y Solter, 2008). Según Barrera et al. (2010), la elevación de la fracción α_2 en los caballos con babesiosis refleja hepatopatía y enfermedad renal, posiblemente derivada de la hemólisis intravascular y por tanto, hemoglobinuria y deshidratación. Los autores también describen que la fracción α_2 podría ser inferior a lo supuesto, debido a la migración hasta esta zona de la haptoglobina (Hp), que puede reducirse en casos de anemia hemolítica (Inoué et al., 2005; Kristensen et al., 2014; Pihl et al., 2016). En la babesiosis, los mecanismos de inmunidad son principalmente de naturaleza humoral, aunque los protozoos también pueden activar la respuesta inmune celular (Tizard, 1996).

Las concentraciones de urea (BUN, '*blood ureic nitrogen*') y de creatinina (CREAT) pueden estar dentro de los límites normales o estar incrementadas. El aumento se suele asociar a la deshidratación y al inicio de una insuficiencia renal (Camacho et al., 2005; Sumbria et al., 2016).

Algunos autores describen la presencia de hipofosfatemia e hipoferremia, atribuida a la anemia y a un metabolismo alterado en los eritrocitos (Frerichs y Holbrook, 1974; Rothschild, 2013; Wise et al., 2013).

9.3.4. Respuesta de fase aguda y proteínas de fase aguda: introducción

Una respuesta de fase aguda (APR, '*acute phase response*') comprende una serie de reacciones complejas y relacionadas que se producen inmediatamente tras una lesión. Se trata de una red o cascada de respuestas por parte del organismo lesionado, como reacción frente a cualquier proceso o agente que desencadene un daño tisular (es decir, infecciones

víricas, parasitarias, bacterianas, traumatismos, cirugías, necrosis isquémicas, quemaduras, neoplasias....) (Jacobsen et al., 2005; 2009; Jacobsen y Andersen, 2007; Crisman et al., 2008; Andersen et al., 2012; Belgrave et al., 2013; Daniel et al., 2016). La APR se caracteriza por numerosos cambios locales y sistémicos, que afectan a diversos tipos celulares y órganos, acompañando tanto a una inflamación aguda como crónica activa (Kushner, 1993; Gabay y Kushner, 1999).

Una APR se inicia cuando las células y tejidos lesionados liberan las denominadas ‘moléculas de alarma’, tales como especies reactivas de oxígeno (ROS, ‘*reactive oxygen species*’), metabolitos del ácido araquidónico y proteínas del hospedador modificadas, las cuales activan a los monocitos y otros macrófagos, para sintetizar un gran número de mediadores inflamatorios, entre los cuales las citokinas desempeñan un papel relevante (Koj, 1996). Los efectos locales, paracrinos y endocrinos de las citokinas propagan la cascada de la APR y estimulan otras células. Además, las citokinas son las responsables de algunos de los síntomas asociados a inflamación e infección, como fiebre, leucocitosis o pérdida de peso (Lennie et al., 1995; Hill et al., 1997; Konsman et al., 2008).

Durante una APR, el metabolismo del hospedador se dirige hacia la eliminación del foco inflamatorio, promoviendo la recuperación y la reparación, y favoreciendo la restauración de la homeostasis (Jacobsen y Andersen, 2007). Un mecanismo esencial en este proceso fisiopatológico es la síntesis de las proteínas de fase aguda (APPs, ‘*acute phase proteins*’), en el hígado. Una APPs es una proteína, cuyas concentraciones plasmáticas/séricas experimentan variaciones de al menos un 25% durante una APR, tanto en procesos infecciosos como no infecciosos (Gabay y Kushner, 1999; Jacobsen y Andersen, 1997; Gruys et al., 2005; 2006; Crisman et al., 2008; Eckersall y Bell, 2010; Cray, 2012; Ceciliani et al., 2012; Schrödl et al., 2016). Las APPs se clasifican en positivas o negativas. Las APPs positivas son aquellas que responden a la inflamación con un incremento de sus concentraciones, dentro de las cuales se incluyen la proteína C reactiva, CRP (Petersen et al., 2004), amiloide sérico A, SAA (Pettersen et al., 2004; Lavoie-Lamoureux et al., 2012; Zabrecky et al., 2015), haptoglobina, Hp (Canisso et al., 2014; Zabrecky et al., 2015; Barrachina et al., 2016; Pihl et al., 2016; Westerman et al., 2016),

fibrógeno, FIB (Borges et al., 2007; Copas et al., 2013; Canisso et al., 2014; Corradini et al., 2014; Hooijberg et al., 2014; Daniel et al., 2016), ceruloplasmina (Auer et al., 1989) y α -1 glucoproteína ácida (Taira et al., 1992). Por el contrario, las APPs negativas experimentan un descenso en sus concentraciones plasmáticas durante un evento inflamatorio, como es el caso de la ALB (Petersen et al., 2004; Zabrecky et al., 2015) o la transferrina (Patterson et al., 1988). Durante una APR, la demanda de aminoácidos para la síntesis de las APPs positivas aumenta de forma intensa, de modo que se produce una priorización de dicha síntesis sobre las proteínas hepáticas, incluidas la ALB. Por este motivo, se produce una regulación negativa de la síntesis de ALB a nivel hepático (Aldred y Schrieber, 1993).

Por otro lado, las APPs se clasifican en APPs mayores o menores y moderadas. Las APPs mayores aparecen en concentraciones mínimas e incluso indetectables en el plasma de animales sanos y experimentan variaciones muy significativas durante un proceso inflamatorio, de hasta 100 veces en relación a los valores basales. Por el contrario, las APPs menores tienen unos niveles plasmáticos muy bajos, si bien detectables, en individuos sanos, y sus concentraciones se modifican solo 1-10 veces durante una APR. En el caballo, las APPs mayores son CRP y el SAA y las menores son la Hp y el FIB (Jacobsen, 2007).

Cada una de estas APPs presenta un perfil cinético diferente, también dependiente de la gravedad de la lesión, del proceso inflamatorio asociado, del agente o factor desencadenante y de la especie animal. Algunas de ellas, como es el caso del SAA, experimentan un incremento pocas h después de una lesión tisular o infección, alcanzando sus valores máximos a los 1-2 días del inicio del proceso (Pepys et al., 1989; Nunokawa et al., 1993; Hultén et al., 2002). La Hp y la CRP tienen tiempos de respuesta medios (Allen y Kold, 1988; Takiguchi et al., 1990; Yamashita et al., 1991; Taira et al., 1992), mientras que la ceruloplasmina y el FIB no suelen alcanzar los valores máximos hasta los 7-10 días tras una inflamación, permaneciendo elevados durante varias semanas (Smith y Cipriano, 1987; Auer et al., 1989; Okumura et al., 1991; Cerón et al., 2005; Borges et al., 2007; Corradini et al., 2014).

9.3.4.1. Amiloide sérico A

El amiloide sérico A (SAA) equino es una apolipoproteína, que circula en sangre formando complejos con las lipoproteínas de alta densidad HDL. Se han identificado diversas isoformas séricas en el caballo (Hultén et al., 1997; Jacobsen et al., 2006; Berg et al., 2011). Si bien el SAA se sintetiza de forma primaria en los hepatocitos, existen fuentes de síntesis extrahepáticas (McDonald et al., 2001; Crisman et al., 2008). Se ha documentado su síntesis en la glándula mamaria, pasando hacia el calostro (McDonald et al., 2001) y en el líquido sinovial equino (Jacobsen et al., 2006; 2016; Crisman et al., 2008).

El SAA se degrada en el hígado (Bausserman et al., 1987) y su vida media es muy corta. Se han descrito valores para su vida media de unos 30 minutos a 2 h en roedores (Uhlar y Whitehead, 1999), por lo que sus valores séricos decrecen rápidamente una vez que su síntesis cesa.

Las funciones del SAA no están muy claras, si bien algunas de ellas se han demostrado in vitro. Se ha observado que el SAA modula algunas funciones leucocitarias, como el estallido respiratorio, la quimiotaxis y la fagocitosis (Gatt et al., 1998; Badolato et al., 2000), influencia la síntesis de mediadores de la inflamación (Malle et al., 1997), afecta al transporte de lípidos hacia el tejido inflamado (Gonnermanwa et al., 1996) e induce a enzimas que intervienen en la degradación de la matriz extracelular, como metaloproteasas, colagenasas y mieloperoxidasas, y en la modulación de la posterior recuperación del tejido conectivo (Jacobsen y Andersen, 2007; Crisman et al., 2008). Otras supuestas funciones son la inhibición de la proliferación de linfocitos y células endoteliales e inhibición de la agregación plaquetaria (Crisman et al., 2008).

Kent (1992) describió las características que definen a una APP con utilidad clínica. Debe tener valores basales bajos o indetectables en animales sanos, con un rango de referencia estrecho, no debe verse afectada por factores fisiológicos, como edad, sexo o base genética del paciente, debe responder de forma rápida e intensa (>100 veces) a una lesión o inflamación, idealmente el nivel de respuesta debe ser proporcional a la cantidad de tejido lesionado, sus valores deben decrecer rápidamente en respuesta al tratamiento,

pero no deben reducirse si no se produce recuperación. Además, una infección secundaria o una recidiva de la condición inflamatoria deben resultar en un nuevo incremento. Finalmente, no debe verse afectada por condiciones no inflamatorias, como estado nutricional, ejercicio, manejo u otras formas de estrés leve.

El SAA posee muchas de estas características, que propician su uso en la clínica equina, frente a las APPs tradicionales, como es el FIB. Las concentraciones basales de SAA son bajas en el caballo, de 0,5 a 20 mg/l (Jacobsen y Andersen, 2007; Coutinho da Silva et al., 2013; Ludwig et al., 2016; Pihl et al., 2016; Westerman et al., 2016). Esta reducida concentración permite una buena interpretación de su elevación tras un estímulo inflamatorio. Su vida media corta posibilita una monitorización segura tras una intervención terapéutica. Además, su determinación secuencial puede utilizarse para el manejo del paciente y para establecer un pronóstico (Back et al., 2015; Pihl et al., 2015; 2016; Turlo et al., 2015; 2016; Westerman et al., 2016). Por todo ello, el SAA es la APPs más utilizada clínicamente en équidos en la actualidad.

Se ha analizado la influencia de diversos factores fisiológicos como edad, sexo o parto en las concentraciones de SAA en el caballo. No está muy claro si esta APPs se ve afectada por la edad. Nunokawa et al. (1993) demostraron que los niveles basales de SAA en potros neonatos y en caballos de edad superior a los 8 años eran ligeramente superiores a los de otros grupos de edad. De igual modo, Paltrinieri et al. (2008) observaron que las concentraciones de SAA se incrementaron en potros recién nacidos, desde el día 0 al 3 y después se redujeron en el día 7 de vida. Sin embargo, otros autores han descrito valores muy bajos e incluso indetectables en potros neonatos (Chavatte et al., 1991; Stoneham et al., 2001; Pollock et al., 2005). Parece ser que las fluctuaciones dependientes de la edad en el SAA equino, si bien existentes, son irrelevantes desde un punto de vista práctico.

Los niveles de SAA no parecen verse afectados de forma significativa por el sexo (Nunokawa et al., 1993), ni tampoco por la gestación, si bien existen pequeños incrementos tras el parto, posiblemente debido al daño tisular inflingido en el canal del parto durante la expulsión del feto (Nunokawa et al., 1993). Estas pequeñas variaciones no limitan su utilidad para monitorizar procesos patológicos que se pueden producir durante la gestación

o tras el parto (Krakowski et al., 2011; Coutinho da Silva et al., 2013; Canisso et al., 2014). En definitiva, las variaciones en SAA en función de la edad, sexo y condiciones fisiológicas son pequeñas y clínicamente irrelevantes, pero desde un punto de vista investigador, deberían ser consideradas (Jacobsen y Andersen, 2007).

Al ser el SAA una APPs mayor en el caballo, y debido a las características ya descritas previamente, su cuantificación se ha aplicado en numerosas condiciones patológicas. Así, se ha demostrado un incremento en caballos con cólico (Dondi et al., 2015; Pihl et al., 2015, 2016; Westerman et al., 2016), en lesiones músculo-esqueléticas diversas (Turlo et al., 2015; 2016), infecciones víricas y bacterianas del sistema respiratorio (Hultén et al., 1999; Hobo et al., 2007; Back et al., 2015), laminitis (Menzies-Gow et al., 2014), cirugías de urgencia y electivas, como castraciones (Jacobsen et al., 2005; 2009; Daniel et al., 2016), y enfermedades articulares de diversas etiologías, sépticas y no sépticas, en potros neonatos y en caballos adultos (Hultén et al., 2002; Hultén y Demmers, 2002; Jacobsen et al., 2006; Passamonti et al., 2015; Ludwig et al., 2016) como patologías más relevantes.

En cuanto a enfermedades de origen parasitario, se ha visto que las infecciones repetidas por ciatostomas y *Strongylus vulgaris* en potros condicionan elevaciones importantes de las concentraciones de SAA (Andersen et al., 2014) e igualmente se ha caracterizado la respuesta inflamatoria al tratamiento antihelmíntico en ponies con ciatostomiasis (Nielsen et al., 2013).

En conocimiento de los autores, la respuesta inflamatoria y los cambios en las APPs no se han analizado aún en caballos con *Babesia caballi* y/o *Theileria equi*. En perros con babesiosis, sí se ha medido la concentración de SAA, a pesar de que esta APPs no es una proteína mayor en esta especie, en la que es más útil la cuantificación de la CRP. No obstante, Matijatko et al. (2007) describieron que, de los 50 perros positivos a *Babesia canis*, introducidos en su estudio, todos ellos tenían valores de SAA elevados el día de la admisión. Además, las concentraciones de SAA se redujeron significativamente en respuesta al tratamiento, lo cual coincide con el resultado obtenido por otros autores, como

Martínez-Subiela et al. (2003) en perros con otras enfermedades parasitarias, como leishmaniosis.

También se ha investigado la relación entre la respuesta del SAA con otros marcadores clásicos de un proceso inflamatorio, como FIB y número de glóbulos blancos (GB). Se ha descrito que el SAA es un indicador más sensible de inflamación y de lesión tisular en el caballo que los dos anteriores marcadores (Chavatte et al., 1991; Nunokawa et al., 1993; Hultén y Demmers, 2002; Jacobsen et al., 2005; Jacobsen, 2007; Jacobsen y Andersen, 2007). Además, la correlación entre SAA y estos biomarcadores de inflamación (GB y FIB) es reducida, tanto en inflamaciones asociadas a procesos infecciosos como no infecciosos (Chavatte et al., 1991; Hultén y Demmers, 2002).

9.3.4.2. Proteína C reactiva

La proteína C reactiva (CRP) es una APPs moderada en el caballo, de modo que sus concentraciones se incrementan varias veces desde los niveles basales tras un estímulo inflamatorio (Takiguchi et al., 1990; Yamashita et al., 1991). El tiempo necesario para que se eleven las concentraciones es de unos 3-5 días tras el inicio de una inflamación.

Con respecto a sus funciones biológicas, la CRP desempeña un papel esencial en la protección frente a la infección, eliminación del tejido dañado, prevención de la autoinmunización y regulación de la respuesta inflamatoria (Mold et al., 2002). Esta APPs se une con numerosas bacterias patógenas o antígenos intracelulares de las células lesionadas, reconociendo por tanto las moléculas anómalas. Además, la CRP tiene otros sitios de unión que activan la vía del complemento, interaccionando con los receptores específicos de las células fagocíticas e induciendo la producción de citocinas anti-inflamatorias. Por tanto, conexas la inmunidad innata no específica con la inmunidad adaptativa específica (Du Clos y Mold, 2001; Pepys y Hirschfield, 2003). Otras funciones de la CRP son la inhibición de la quimiotaxis y del estallido respiratorio neutrofilico (Mortensen y Zhong, 2000).

En el caballo, se ha documentado un incremento de CRP en inflamaciones asépticas inducidas por turpentina (Yamashita et al., 1991), en caballos adultos con neumonía, enteritis y artritis (Takiguchi et al., 1990) y en laminitis inducida experimentalmente (Fagliari et al., 1998). En niños neonatos, se ha descrito una elevación muy intensa, más de 1000 veces sobre los niveles basales, en caso de sepsis, produciéndose dicho aumento en un plazo de h (Hofer et al., 2012). Además, las concentraciones persisten elevadas hasta la resolución del proceso. Una vez que la sepsis cesa, el descenso es muy rápido, en unas 19 h (Pasternak et al., 2016; Patil et al., 2016). Por el contrario, las concentraciones de CRP no han sido útiles para diferenciar potros neonatos enfermos con y sin sepsis neonatal (Zabrecky et al., 2015).

En casos de malaria humana no complicada, producida por el parásito *Plasmodium falciparum*, que puede considerarse como una patología protozoaria que cursa con sepsis, de forma similar a la babesiosis canina (Jacobson et al., 2002), los estudios clínicos han demostrado elevaciones de CRP (Graninger et al., 1992). Gillespie et al. (1991) confirmaron que la medición secuencial de CRP tiene valor predictivo en el curso clínico del proceso. De forma similar, Matijatko et al (2007) encontraron una elevación de CRP en perros con babesiosis, descendiendo estos valores en un plazo de 1 a 8 días en respuesta al tratamiento. Los niveles de CRP fueron altos en perros con babesiosis no complicadas, si bien fueron significativamente superiores en aquellos animales que tuvieron una babesiosis con complicaciones (Matijatko et al., 2007).

9.3.4.3. Haptoglobina

La haptoglobina (Hp), glucoproteína compuesta de dos subunidades peptídicas, es un constituyente de las α -globulinas, sintetizada en el hígado (Murata et al., 2004; Pollock et al., 2005). No obstante, la correlación entre la Hp y las α -globulinas es reducida ($r=0,520$), indicando que la Hp no es el único factor que influencia la concentración de α -globulinas en procesos inflamatorios en el caballo (Hultén et al., 2002).

La principal función biológica de la Hp es la unión con la HB libre en el plasma, que es tóxica y pro-inflamatoria (Wagener et al., 2001), reduciendo el daño oxidativo asociado a hemólisis, incluyendo la acción nefrotóxica sobre las células de los túbulos renales (Yang et al., 2003). El complejo conformado por la Hp-HB es reconocido a través del CD163, un receptor de superficie específico de los macrófagos (Schaer et al., 2002), procediendo a su fagocitosis. Se han descrito numerosos efectos inmunomoduladores de esta APP. Esta inmunomodulación viene parcialmente mediada por la unión de la Hp a los receptores CD11/CD18 de las células efectoras (El-Ghmati et al., 1996). La Hp tiene un efecto inhibitorio sobre la quimiotaxis de los granulocitos, la fagocitosis y su actividad bactericida (Rossbacher et al., 1999). La Hp puede además, inhibir la proliferación de las células cebadas (El-Ghmati et al., 2002), impidiendo la maduración espontánea de las células epidérmicas de Langerhans, que actúan en la presentación de los antígenos en la piel (Xie et al., 2000) o en la supresión de la proliferación de células T (Baseler y Burrell, 1983; Murata y Miyamoto, 1993; Arredouani et al., 2003).

La edad parece influir en las concentraciones plasmáticas de Hp en el caballo. Así, la concentración de Hp fue mayor en potros neonatos, permaneciendo elevada hasta los 12 meses de edad, descendiendo a partir de los 18 meses (Taira et al., 1992). Los niveles sanguíneos más elevados en los potros neonatos se han atribuido al papel de la Hp en la eliminación de la HB libre producida por isoeritrolisis. De este modo, parece existir una correlación negativa entre las concentraciones de Hp y la edad (Pihl et al., 2015). Por otro lado, Taira et al. (1992) describieron que las concentraciones de Hp en los machos son ligeramente superiores a las hembras, al contrario de lo observado por Cywinska et al. (2011) en caballos Pura Sangre Inglés en entrenamiento y por Pihl et al. (2015) en caballos con cólico. La gestación y el parto no parecen afectar a las concentraciones sanguíneas de esta APP, ni en yeguas ni en burras (Aziz et al., 2012; Canisso et al., 2014).

Con respecto a su cinética, es una APP moderada en équidos, incrementándose más lentamente que el SAA y permaneciendo elevada durante al menos 72 h una vez concluido el proceso inflamatorio (Pollock et al., 2005). En los últimos años, se han llevado a cabo diversas investigaciones sobre la utilidad diagnóstica y fundamentalmente pronóstica de la

Hp en varias enfermedades equinas. De este modo, la concentración de Hp parece aumentar en caballos con cólico (Pihl et al., 2015). Sin embargo, algunos autores no encuentran diferencias entre caballos con diversos tipos de cólico (inflamatorios vs. quirúrgicos) en el momento de la admisión al hospital (Westerman et al., 2015). Por el contrario, en otras investigaciones, no se han hallado diferencias en Hp entre caballos control y con cólico (Westerman et al., 2016) y la introducción de este parámetro junto a GB, otras APPs y otros marcadores de inflamación, no mejoró la predicción del modelo diseñado para predecir cólicos quirúrgicos (Pihl et al., 2016). Por otro lado, Dondi et al. (2015) describieron que, los caballos con lesiones estrangulantes-isquémicas, mostraban niveles de Hp inferiores a los caballos con otro tipo de cólico, resultado que se atribuyó a la existencia de hemólisis o daño muscular fibrilar, con liberación de mioglobina. La concentración de Hp también se ha analizado en yeguas con patologías uterinas. Canisso et al. (2014) documentaron una elevación de las concentraciones séricas de Hp en yeguas tras la inducción experimental de una placentitis, permaneciendo las concentraciones incrementadas hasta el momento del aborto. Además, estos autores observaron que una gestación sana, con un resultado exitoso, no modifica las concentraciones de Hp. Por el contrario, la medición de Hp en el líquido del lavado uterino no es útil para el diagnóstico de endometritis subclínica, sin encontrarse correlación con la biopsia uterina (Sikora et al., 2016).

La Hp también se ha analizado en caballos con patologías respiratorias, con resultados diversos. Leclere et al. (2015) no encontraron valores superiores de Hp en caballos con enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias (IAD, '*inflammatory airway disease*'), en comparación con caballos presentados por otras causas de pérdida de funcionalidad. Estos resultados contrastan con los de Bullone et al. (2015), quienes documentaron que los caballos con IAD tenían valores séricos de Hp superiores al grupo control y además, la consideración conjunta de esta APP, junto con la proteína surfactante D, mostró una especificidad y sensibilidad elevada para el diagnóstico de este proceso respiratorio. Algunos años antes, Lavoie-Lamoreaux et al. (2012) habían publicado que, las concentraciones de Hp en sangre eran superiores en todos los tiempos en caballos con obstrucción de vías respiratorias (RAO, '*recurrent airway disease*'), sin sobreponerse en ningún caso con los valores de los caballos sanos. En base a estos resultados, Lavoie-

Lamoreaux et al. (2012) concluyeron que, la Hp es un marcador tanto de inflamación aguda como crónica, mientras que la elevación de SAA revela una inflamación aguda.

En équidos, los ciatostomas y los estróngilos desencadenan una respuesta inflamatoria de intensidad moderada, como se ha demostrado con el incremento medio que experimenta la Hp (Andersen et al., 2014). Por otro lado, se produce un aumento leve en respuesta a diversos tratamientos antihelmínticos (oxibendazol, pirantel y moxidectina) (Nielsen et al., 2013).

En perros con babesiosis, el comportamiento de la Hp es irregular. Ello se debe a dos motivos. Por un lado, está el efecto de la inflamación, que produce un incremento moderado de Hp (Martínez-Subiela et al., 2002; Ulutas et al., 2005; Matijatko et al., 2007) y por otro lado, está la influencia de la hemólisis, que reduce la concentración de Hp (Weidmeyer y Solter, 1996). Es importante en este contexto tener en cuenta que la Hp se une a la HB libre, y el complejo resultado es eliminado por el sistema retículo-endotelial, resultando en un descenso de Hp sérica. Por tanto, la Hp en este tipo de patologías es el resultado del equilibrio entre la síntesis y el aclaramiento de esta APP de la circulación, en asociación con la magnitud de la inflamación y de la hemólisis (Ulutas et al., 2005). Por tanto, la Hp no es un marcador laboratorial ideal para monitorizar enfermedades inflamatorias que cursen con hemólisis. Un aspecto interesante a tener en cuenta es que la administración de dipropionato de imidocarb no resulta en un incremento de las concentraciones de Hp, al menos en perros (Matijatko et al., 2007).

9.3.4.4. Fibrinógeno

El fibrinógeno (FIB) ha sido la APP utilizada habitualmente en la clínica equina, debido a la facilidad y reducido coste económico de su medición. Está presente en concentraciones medias en la sangre de caballos sanos, experimentando incrementos de 2-4 veces en respuesta a un estímulo inflamatorio (Jacobsen y Andersen, 2007). El procedimiento de determinación más usado es el método de precipitación con calor, que es

altamente insensible a pequeñas modificaciones de su concentración (<100mg/dl) (Allen y Kold, 1988; Pollock et al., 2005; Borges et al., 2007). Además, el rango de variación en caballos sanos es muy amplio y tarda varios días en incrementarse tras el inicio del proceso inflamatorio, con un pico en unos 3-5 días (Hultén et al., 2002; Borges et al., 2007; Corradini et al., 2014; Daniel et al., 2016).

El FIB, además de ser una APP moderada, interviene en la hemostasis, proporcionando un sustrato para la formación de fibrina, y para la recuperación tisular, favoreciendo la migración de las células inflamatorias (Rubel et al., 2001). De forma específica, el FIB se une con las integrinas CD11/CD18 de la superficie celular de los fagocitos migrados, desencadenando una cascada de señales intracelulares que dan lugar a degranulación, fagocitosis, citotoxicidad celular dependiente de la respuesta humoral y retraso de la apoptosis (Rubel et al., 2001; Murata et al., 2004). La intervención del FIB en la cascada de la coagulación complica la interpretación de sus concentraciones durante una inflamación. De este modo, los niveles pueden reducirse en caso de insuficiencia hepática, consumo exagerado, como ocurre en enfermedades que cursan con CID o con cambios en la permeabilidad vascular, enmascarando por tanto, el incremento asociado al evento inflamatorio (Andrews et al., 1994; Murata et al., 2004; Borges et al., 2007; Jacobsen, 2007; Corradini et al., 2014; Daniel et al., 2016).

Se ha descrito un incremento de las concentraciones de FIB en inflamaciones inducidas por la administración intramuscular de co-adyugante de Freund (Mills et al., 1998), en artritis no infecciosas inducidas (Hultén et al., 2002) y en respuesta a cirugías electivas, como castraciones, laringoplastias, estafilectomías y ovariectomías (Jacobsen et al., 2005; 2009; Pollock et al., 2005). En estos estudios, se ha visto que el incremento en los niveles sanguíneos de FIB se produce en unas 36-72 h, descendiendo a partir de los 6 días post-lesión. No obstante, tanto la intensidad de su elevación como el momento en el que se produce la reducción dependen del tipo de cirugía y de la magnitud de la inflamación. De este modo, la cirugía ósea para el tratamiento de quistes subcondrales no produjo una elevación hasta los 6 días post-cirugía (Allen y Kold, 1988). Además, en este caso, las concentraciones perduraron altas durante los 15 días tras la cirugía, posiblemente

debido a un proceso inflamatorio persistente durante más tiempo tras una cirugía ósea (Allen y Kold, 1988). De hecho, Jacobsen et al. (2009) observaron que la respuesta del FIB dependía de la gravedad de la causa de la cirugía, encontrando diferencias significativas en caballos sometidos a tres tipos de intervenciones, artroscopias, correcciones de hemiplejía laríngea y celiotomías, siendo los niveles de FIB superiores en el tercer tipo de cirugía. Además, Jacobsen et al. (2009) vieron que, los niveles de FIB post-cirugía dependían de los valores previos a la cirugía, de modo que los caballos con concentraciones superiores antes de la cirugía, también tenían más FIB tras la misma. También documentaron que las concentraciones de FIB no se ven afectadas por la edad del paciente, ni por la anestesia, si bien este último aspecto ya había sido descrito previamente por Allen y Kold (1988).

En potros neonatos críticos y con sepsis, una concentración elevada de FIB se asoció a un peor pronóstico (Peek et al., 2006). De igual modo, la concentración de FIB es superior en caballos adultos con peor pronóstico (más elevado en caballos con inflamación sistémica y con mala resolución, eutanasia o muerte) (Corradini et al., 2014). Si bien el FIB es muy específico para diagnosticar inflamación, no permite distinguir entre procesos agudos, subagudos y crónicos (Borges et al., 2007; Hooijberg et al., 2014). Por tanto, no se han encontrado diferencias en los niveles de FIB entre caballos con inflamaciones de diferente duración, lo cual ha sido atribuido a la cinética del FIB, al tratarse de una APP de evolución lenta en respuesta a la inflamación (Borges et al., 2007). Además, tampoco permite diferenciar inflamaciones locales de sistémicas (Borges et al., 2007; Hooijberg et al., 2014). Igualmente, las concentraciones de FIB no reflejaron de forma exacta la inflamación tras cirugías abdominales de urgencia en caballos (Daniel et al., 2016). En todos estos estudios (Borges et al., 2007; Corradini et al., 2014; Hooijberg et al., 2014; Daniel et al., 2016), la sensibilidad del FIB para el diagnóstico de inflamación en caballos fue baja, si bien puede incrementarse al ser considerada de forma conjunta con otras APPs, como el SAA, u otros marcadores de inflamación, como el hierro. No obstante, la especificidad del FIB es elevada como indicativo de inflamación.

En caballos con infección por estróngilos, pequeños y mayores, se ha observado que, la respuesta inflamatoria es pronunciada en la mucosa del intestino grueso, también

tras el tratamiento con antihelmínticos, si bien las concentraciones sanguíneas de FIB o no varían significativamente (Steinbach et al., 2006) o lo hacen de forma muy leve (Nielsen et al., 2014), reflejo de la reducida inflamación sistémica inducida por estos parásitos.

En perros con babesiosis, la hiperfibrinogemia es un hallazgo común, tanto en casos de babesiosis natural (Furlanello et al., 2005; Máthé et al., 2006; Matijatko et al., 2007; Ruiz de Gopegui et al., 2007; Goddard et al., 2013; Rafaj et al., 2013) como experimental (Schetters et al., 1997), llegando a encontrarse hasta en un 74% de los pacientes (Ruiz de Gopegui et al., 2007). La hiperfibrinogenemia persiste hasta 3 días después de iniciar la terapia (Rafaj et al., 2013). No obstante, hay que tener en cuenta, que en casos de CID, se puede producir un descenso significativo de los niveles de FIB en perros con babesiosis (Ruiz de Gopegui et al., 2007).

9.3.4.5. Otros marcadores de inflamación: leucograma e indicadores de metabolismo férrico

Además de las modificaciones en las concentraciones de APPs, y también a consecuencia de una APR, se producen diversos cambios hematológicos y bioquímicos. Entre ellos, destacan las variaciones en el leucograma, que se utilizan frecuentemente como marcadores de inflamación. Debido a la función defensiva de los GB, cuando existe un proceso inflamatorio, el número periférico de GB puede variar muy rápidamente (Kushner 1982; Koj 1989).

Durante una reacción inflamatoria, iniciada por una amplia variedad de estímulos exógenos y endógenos, los leucocitos migran a través de las paredes de los vasos sanguíneos hacia el tejido extravascular, donde ejercen gran variedad de funciones biológicas. Estas células también pueden salir de la circulación bajo condiciones fisiológicas, como parte de su función de vigilancia. En ambas migraciones, tanto inflamatoria como homeostática, algunas moléculas de adhesión y citokinas con funciones

muy específicas, controlan la activación y el influjo de estas células (Koj, 1996; Montoya et al., 2003).

Este tráfico característico de los leucocitos se cumple en una cinética de pasos sucesivos, que va desde el contacto inicial del leucocito con el endotelio vascular, hasta alcanzar la matriz extracelular, proceso que requiere de una fina interacción entre parejas de moléculas de adhesión expresadas en la superficie de los leucocitos, las células endoteliales y la matriz extracelular (Montoya et al., 2003). Por ello, en una APR, el papel de los leucocitos, y particularmente de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (NEU), plaquetas, linfocitos T, células endoteliales y fibroblastos no debe omitirse (Koj, 1996).

En la sangre circulante de mamíferos, existen cinco tipos diferentes de leucocitos: NEU, polimorfonucleares eosinófilos (EOS), polimorfonucleares basófilos (BAS), monocitos (MON) y linfocitos (LINF). En su tarea de defender al organismo frente a diversos agentes, participan por un lado granulocitos y MON, y por otro LINF. Los primeros fagocitan y destruyen los agentes infecciosos, mientras que los LINF fijan los microorganismos y los destruyen mediante otros mecanismos como la producción de interleukinas (Tizard, 1987; Roitt et al., 1991).

Los NEU son los GB más abundantes en mamíferos, constituyen entre el 60% y el 75% de los GB sanguíneos en carnívoros y hombre, pero sólo el 20%-30% en los rumiantes (Tizard, 1987). Se encargan de la destrucción de las sustancias extrañas por fagocitosis, pero para ello los NEU deben abandonar los vasos sanguíneos por diapédesis, siendo atraídos hacia el lugar por gradientes químicos externos, mediante la quimiotaxis (Tizard, 1987; Roitt et al., 1991; Welles, 2010). Los EOS, también originados en la médula ósea, constituyen el 2-3% del número total de GB. Se ha demostrado que presentan quimiotaxis por los tejidos que han liberado gran cantidad de histamina, y allí son capaces de neutralizar los efectos inflamatorios de sustancias como histamina, serotonina y bradikinina, gracias a la presencia de peroxidasa en el interior de sus gránulos específicos. Son muy abundantes en personas y animales que sufren procesos parasitarios (Tizard, 1987; Roitt et al., 1991; Foster y Cunnigham, 2003; Welles, 2010). Los BAS, también originarios de la médula

ósea, son los leucocitos menos abundantes en la sangre de équidos. Actúan fundamentalmente como células secretoras, liberan sus contenidos en los tejidos en presencia de complejos antígeno-anticuerpo y, como resultado de esta degranulación, aumenta la permeabilidad vascular, y se produce vasodilación y quimiotaxis de EOS (mecanismos muy importantes en el proceso inflamatorio) (Carrick y Begg, 2008; Welles, 2010). Los MON y macrófagos se originan bien desde las células del bazo, bien desde la médula ósea. Hay que considerar el sistema monocito/ macrófago como un sistema fagocitario generalizado, que se encuentra repartido por todos los tejidos (Tizard, 1987; Johnston, 1988; Roitt et al., 1991; Carrick y Begg, 2008; Welles, 2010).

Tras una respuesta celular inicial al estímulo inflamatorio, se produce un incremento de NEU en la circulación periférica, condicionando leucocitosis (West, 1989; Welles, 2010). Los MON suelen llegar al sitio de la inflamación unas 24-36 h después, tras una migración inicial de los macrófagos tisulares, que constituyen la primera línea de defensa. Estos secretan interleukina I (IL-1), que hace que las células del endotelio vascular desarrollen lugares de unión en la superficie de su membrana, aumentando de esta forma las posibilidades de los NEU para unirse a ellas. La IL-1 es un factor iniciador de la APR (Mills et al., 1998).

Durante el proceso inflamatorio, la médula ósea produce cantidades superiores de granulocitos y MON (Del Maestro, 1984; Boxer y Smolen, 1988; Welles, 2010). Este aumento en la producción, que puede llegar a alcanzar hasta 50 veces el valor normal, está provocado principalmente por el factor de necrosis tumoral, TNF y la IL-1. Por tanto, esta combinación de TNF e IL-1, constituye un mecanismo de retroalimentación, que comienza en la inflamación de los tejidos, continúa con la formación de los leucocitos defensivos y elimina finalmente la causa de la inflamación (Del Maestro, 1984; Roitt et al., 1991; Carrick y Begg, 2008).

El diagnóstico diferencial primario para una leucocitosis marcada incluye las enfermedades infecciosas, neoplásicas e inmunomediadas (Lucroy y Madewell, 1999; 2001), mientras que las causas de la leucopenia incluyen una disminución de la producción en médula ósea o una infección peraguda. La evaluación de los NFS para evidenciar

cambios tóxicos puede ayudar a distinguir un proceso inflamatorio subyacente de otras causas de leucocitosis.

Debido a la utilización clásica del leucograma en el diagnóstico de procesos inflamatorios en équidos, diversas investigaciones han evaluado la relación de estos marcadores con las APPs (Mills et al., 1998; Hultén y Demmers 2002; Jacobsen et al., 2005). Esto es especialmente importante en el manejo de enfermedades de los potros recién nacidos y potros jóvenes. Hultén y Demmers (2002) realizaron un estudio con 25 potros con debilidad neonatal, neumonía y diarrea, y vieron que la medición de SAA podría ser una ayuda en el diagnóstico diferencial de los potros neonatales débiles, en aquellos que presentaban como síntoma principal la diarrea. Además, las cuantificaciones seriadas del SAA podrían añadir información en la monitorización del tratamiento en neumonías por *Rhodococcus equi*, respondiendo más rápidamente que los GB (Hultén y Demmers, 2002).

El hierro (Fe) es un bioelemento indispensable para los seres vivos y juega un papel esencial en el metabolismo oxidativo, en el crecimiento, en la proliferación celular y en el transporte de oxígeno. En el organismo, el Fe se reparte en varios compartimentos: a) el compartimento del llamado Fe funcional, que incluye la HB, la mioglobina, las enzimas del hemo y otras enzimas no hemo, peroxidasas, catalasa, citocromo c oxidasa, deshidrogenasas y oxidasas (Malmström et al., 1970), b) el Fe de transporte, representado por la transferrina y c) el Fe de almacenamiento, entre cuyos componentes se incluyen la ferritina (FERR) y la hemosiderina. Además, existen otras proteínas como el receptor de la transferrina, que regula la endocitosis del Fe por las células, y unas proteínas denominadas IRP (*iron regulatory proteins*) que juegan un papel crucial en la síntesis de los diversos elementos que intervienen en el metabolismo férrico (Arthur y Isbister, 1987; Brittenham et al., 2000).

El Fe puede ser almacenado bajo dos formas moleculares diferentes: depósitos de FERR (18%) que almacenan Fe en una forma relativamente movilizable, y depósitos de hemosiderina (16%), que es una forma más estable de acumulación de reservas. La cinética del Fe en el organismo es fundamentalmente conservativa, excretándose casi exclusivamente la parte no absorbida en el intestino, en una cantidad diaria no superior a 1

mg. Al igual que para la absorción, los enterocitos también regulan la excreción de Fe (Kaneko, 1980; Smith, 1989).

El metabolismo del Fe en el organismo se puede ver alterado, bien por un insuficiente consumo en la dieta, bien por la acción de diferentes procesos patológicos que modifican los niveles normales de Fe, transferrina y FERR séricos. La valoración del estatus férrico en el animal, junto a la hematología, es de gran ayuda en el diagnóstico diferencial de procesos anémicos tales como la anemia ferropénica, la anemia de tipo inflamatorio o la anemia hemolítica. La correcta valoración del estatus férrico debe incluir la determinación de los tres parámetros anteriormente mencionados (Weeks et al., 1989; Smith, 1992; Hyypä et al., 2002; Assenza et al., 2016).

En perro, unos niveles bajos de Fe sérico no son diagnósticos por si mismos de un estado deficiente, ya que pueden ser compatibles con procesos inflamatorios que determinan una APR en el animal (Liste et al., 1995). La concentración de transferrina, determinada de forma indirecta a partir de la capacidad total de unión al hierro (TIBC, '*total iron binding capacity*') puede disminuir en los estados inflamatorios, manteniéndose dentro del rango de valores normales en la deficiencia de Fe en el perro (Smith, 1992; McCown y Specht, 2011; Bohn, 2015), al contrario del descenso observado en seres humanos (Andrews, 1999). La determinación de FERR permite la distinción entre ambos procesos, ya que sus niveles disminuyen en la situación deficiente y tienden a elevarse durante la fase inflamatoria, como reflejo del aumento de los depósitos férricos en las células del sistema reticuloendotelial (Smith y Cipriano, 1987; Weeks et al., 1989; Smith, 1992; Bohn, 2013; 2015; Chikazawa et al., 2013).

En caballos, se ha considerado que la disminución en la concentración sérica o plasmática de Fe podría ser un buen indicador de enfermedad inflamatoria aguda (Smith y Cipriano, 1987; Jacobsen et al., 2005; 2009; Borges et al., 2007; Corradini et al., 2014). De este modo, la concentración de Fe descendió antes del inicio de la sintomatología en un modelo experimental de infección por *Streptococcus zooepidemicus*, siendo inversamente proporcional dicha reducción a la intensidad de la sintomatología (Varma et al., 1984). En un estudio con ponies Shetland, la concentración de Fe se redujo hasta un valor inferior al

25% del grupo control a las 24 h del inicio de una inflamación inducida por la administración IM de turpentine (Smith y Cipriano, 1987). Posteriormente, Jacobsen et al. (2005) evaluaron las modificaciones en los marcadores de inflamación tras una castración y observaron que los niveles sanguíneos de SAA y de Fe reflejaban de forma exacta el curso de la inflamación. Por el contrario, estos autores también encontraron que, la presencia de fiebre y la evolución del número de GB no eran útiles en la monitorización de la inflamación post-castración (Jacobsen et al., 2005). Estos mismos autores, evaluaron la respuesta inflamatoria a cirugías electivas de diversa intensidad, y describieron que los niveles de SAA y de Fe se modificaron con mayor rapidez que otros marcadores de inflamación. Un hallazgo importante en esta investigación fue que, los valores de SAA y de Fe tras la cirugía no eran dependientes de los valores previos a la misma. Sin embargo, los caballos que tuvieron medias más elevadas de leucocitos y de FIB antes de la cirugía también mostraron valores superiores tras la cirugía, y en comparación con los caballos que partían de valores inferiores (Jacobsen et al., 2005).

Estos resultados coinciden con los reseñados por Borges et al. (2007), quienes demostraron que una concentración reducida de Fe en sangre es un biomarcador sensible de inflamación sistémica en el caballo, independientemente de la duración del proceso, y permitiendo la discriminación de caballos con inflamaciones locales. Estos autores incluyeron en su estudio un total de 97 caballos con diversas patologías que cursaron con inflamación sistémica, 22 caballos con inflamación localizada y 12 caballos clínicamente sanos y sometidos a transporte. Las concentraciones séricas de Fe de los tres grupos fueron de 64, 123 y 143 $\mu\text{g}/\text{dl}$, respectivamente. Una concentración baja de Fe junto con valores elevados de FIB, según esta investigación, son indicadores sensibles de inflamación sistémica, con una sensibilidad del 90 y 82% de forma respectiva. Además, se apreció una correlación entre una reducción progresiva de la concentración sérica de Fe con un peor pronóstico durante la hospitalización (Borges et al., 2007). Estos resultados han sido recientemente corroborados por Corradini et al. (2014), sobre un total de 135 caballos con diversas patologías. Además, en esta última publicación se encontró que, los caballos que sobrevivieron normalizaron sus concentraciones de Fe durante la hospitalización. Por el contrario, aquellos animales que fallecieron o bien fueron eutanasiados, tuvieron

concentraciones de Fe persistentemente bajas durante su hospitalización (Corradini et al., 2014).

Del mismo modo, Hooijberg et al. (2014) evaluaron la sensibilidad de estos marcadores de inflamación en caballos con procesos inflamatorios de diversa duración, extensión y causa, y hallaron que, la concentración de SAA es el marcador más fiable para el diagnóstico de inflamación, mientras que el examen conjunto de SAA e Fe tuvo la máxima sensibilidad para diferenciar entre inflamación sistémica y localizada.

La concentración de Fe, en conocimiento de los autores, solo se ha evaluado en un artículo, en perros con babesiosis, donde se encontraron niveles reducidos de Fe y de TIBC (Furlanello et al., 2005).

Los procesos inflamatorios, incluyendo las infecciones y endotoxemias, se acompañan de estos descensos de las concentraciones de Fe circulante como mecanismo de resistencia no específica a la agresión. Algunas observaciones sobre el intercambio de Fe en inflamación, sugieren que existe una disminución de la absorción digestiva de este mineral, así como una mayor captación por parte de las células del sistema retículo-endotelial, causando un descenso de los niveles sanguíneos (Baynes et al., 1986). Se cree que esta respuesta es muy rápida tras el insulto inflamatorio, y viene mediada por un péptido hepático, la hepcidina (Ganz, 2003; Means, 2004; Nemeth et al., 2004). La inflamación conduce a una elevación de las concentraciones sistémicas de IL-6, que estimula de forma directa a los hepatocitos, liberando hepcidina, que bloquea el canal de eflujo de Fe de los macrófagos, desencadenando una hipoferremia de rápida instauración (Nemeth et al., 2004). Esta respuesta del hospedador es particularmente útil durante las primeras fases de la inflamación, antes de que intervengan otros componentes de la inmunidad adaptativa e innata.

9.3.5. Relación entre inflamación y hemostasia. Alteraciones hemostáticas en procesos inflamatorios

La hemostasia es un mecanismo de defensa del organismo que se activa tras haber sufrido un traumatismo o lesión, previniendo la pérdida de sangre de los vasos sanguíneos. En el proceso hemostático es conveniente distinguir tres fases: una fase vascular, una fase plaquetaria y una fase plasmática. La fase vascular y plaquetaria constituyen la hemostasia primaria, en la que intervienen al menos dos factores presentes en el plasma, el factor von Willebrand (vWF) y el FIB (Ranney y Rapaport 1990).

La hemostasia primaria concluye con la formación de un trombo hemostático como resultado de la agregación plaquetaria, facilitada por un proceso de vasoconstricción del vaso dañado. La coagulación permite la consolidación del trombo plaquetario mediante la intervención de la trombina, que transforma el FIB en fibrina. La formación de la trombina es consecuencia de una cadena de reacciones en las que intervienen factores de la coagulación (Ranney y Rapaport 1990; Lassen y Swardson, 1995; Brooks, 2008; Epstein, 2014).

Debido a que la respuesta inflamatoria es inseparable del proceso de coagulación, los trastornos de la coagulación a menudo se asocian con una enfermedad inflamatoria grave. Normalmente, se mantiene un equilibrio entre coagulación y fibrinólisis para prevenir la hemorragia y la trombosis diseminada (Webster, 2002; Vincent y De Backer, 2005). Se sabe que la inflamación afecta directamente a la coagulación a través de tres mecanismos principales: 1) activación de la coagulación, 2) regulación negativa de los anticoagulantes endógenos, y 3) inhibición de la fibrinólisis (Esmon et al., 1999; Levi y Van Der Poll, 2005). La pérdida de la integridad estructural y funcional del endotelio conduce a disfunción endotelial, con reducción de la capacidad endotelial de mantener la hemostasis, resultando en activación hemostática, inflamación y vasoconstricción (Sahni, 2007; Chen et al., 2011).

Las citocinas inflamatorias son mediadores fundamentales del sistema inmune, y entre ellas, se ha demostrado que la IL-6 estimula la producción de plaquetas (Peng et al.,

1996; Burstein, 1997). Las plaquetas producidas en respuesta a la inflamación son más trombogénicas y con una mayor sensibilidad a los agonistas plaquetarios (Peng et al., 1996; Burstein, 1997). Las endotoxinas bacterianas, el tromboxano A₂, el factor activador de plaquetas y la catepsina G (una enzima liberada por neutrófilos) actúan como activadores plaquetarios (Selak et al., 1988; Saluk-Juszczak et al., 1999; Zimmerman et al., 2002).

La inflamación inducida por la activación plaquetaria puede perpetuar la respuesta inflamatoria por dos medios. En primer lugar, las plaquetas activadas se agregan para proporcionar la superficie de fosfolípido cargada negativamente necesaria para que se produzca la hemostasia secundaria, cuyo resultado final es la formación de trombina. La trombina se considera tradicionalmente como el catalizador para la conversión del FIB en fibrina. La trombina modula el sistema inflamatorio a través de la unión a un grupo específico de receptores de superficie celular conocidos como receptores activados por proteasa (Levi y Van Der Poll, 2005). En segundo lugar, las plaquetas activadas interactúan con las células endoteliales subyacentes para estimular la adhesión y el reclutamiento de leucocitos inflamatorios (Dugina et al., 2002). Las plaquetas activadas pueden sintetizar IL-1 β , que actúa sobre las células endoteliales para mejorar sus propiedades adhesivas (Lindeman et al., 2001).

En la coagulación inducida por la inflamación también interviene el factor tisular. Un estado procoagulante neto se produce además, por el funcionamiento deteriorado de los mecanismos anticoagulantes, entre los que se encuentra el sistema de proteína C. Los receptores activados por proteasa (PARs) forman el enlace molecular entre coagulación e inflamación. El PAR1 media tanto los efectos celulares perjudiciales (inducidos por la trombina) como protectores (inducidos por la proteína C activada). La proteína C activada protege contra la mortalidad en endotoxemia experimental y sepsis por efectos que dependen de PAR1, no en las propiedades anticoagulantes de esta proteína (Van Der Poll et al., 2011).

La inflamación y la coagulación constituyen dos sistemas de defensa del huésped con funciones complementarias en la eliminación de patógenos invasores, limitando el daño tisular y restaurando la homeostasis. Existe una estrecha correlación entre ambos

sistemas, por lo que la inflamación conduce a la activación de la coagulación, y la coagulación afecta considerablemente la actividad inflamatoria (O'Brien, 2012). La infección conduce a la producción de citocinas proinflamatorias que, a su vez, estimulan la producción de factor tisular. La activación del sistema de coagulación y la consiguiente generación de trombina dependen de la expresión del factor tisular. Por el contrario, las proteasas de coagulación activadas pueden afectar a receptores específicos en células inflamatorias y células endoteliales y, de este modo, modulan la respuesta inflamatoria. La activación de la coagulación con la regulación simultánea de los mecanismos anticoagulantes endoteliales y fibrinólisis endógena caracteriza la fisiopatología de la sepsis (Cheng et al., 2011; O'Brien, 2012).

En la actualidad existen pruebas de laboratorio que evalúan específicamente las vías extrínseca e intrínseca de la coagulación sanguínea. Estas pruebas son el tiempo de protrombina (TPT) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), con una amplia utilidad en medicina veterinaria para el diagnóstico de alteraciones de la coagulación (Brooks, 2008; Epstein, 2014).

El tiempo de protrombina (TPT) proporciona información sobre el factor extrínseco (factor tisular) y las vías de coagulación comunes. Unos valores TPT prolongados indican una posible deficiencia de los factores II, V, VII, o X o de FIB (Taylor, 2003; Greaves, 2004; Brooks, 2008; Epstein, 2014). La medición del TPT se lleva a cabo con frecuencia para detectar trastornos de coagulación adquiridos, incluyendo deficiencia o antagonismo del factor vitamina K, enfermedad hepática y CID (Chee y Greaves, 2003; Brooks, 2008; Epstein, 2014).

El tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) evalúa las deficiencias e inhibición de las vías intrínseca (activación por contacto) y común de la coagulación. Los valores prolongados de este parámetro indican una posible deficiencia de factores II, V, VIII, IX, X, XI o XII, prekalicreína, quinínogeno de alto peso molecular (HMWK) o FIB (Taylor, 2003; Greaves 2004; Brooks, 2008; Epstein et al., 2013; Epstein, 2014).

En caballos, se han publicado diversos estudios que relacionan las alteraciones de los parámetros hemostáticos con la inflamación, fundamentalmente en caballos con patologías gastrointestinales (Epstein et al., 2013; Cesarini et al., 2014), endotoxemia (McGovern et al., 2013) o en potros sépticos (Dallap Schaer et al., 2009; Méndez-Angulo et al., 2011). En conocimiento de los autores, no se han evaluado las variaciones hemostáticas en caballos con infecciones por *Theileria equi* o *Babesia caballi*. Sin embargo, sí existe información en perros afectados por *Babesia canis*.

En la babesiosis canina se ha visto que, la disfunción endotelial, la interacción de las células sanguíneas con el endotelio y la activación de la cascada de la coagulación secundaria a una respuesta inflamatoria aguda conllevan a trastornos de la hemostasia, que contribuyen a la patogénesis del proceso. Los efectos vasculares podrían ser un mecanismo fisiopatológico importante en esta patología (Rafaj et al., 2009; 2013). Rafaj et al. (2009), sin embargo, no hallaron diferencias en (TPT) ni en aPTT en perros con babesiosis en comparación con un grupo control, lo cual no coincide con lo reseñado previamente por Schetters et al. (1997), quienes documentaron una elongación del aPTT en el momento en el que se apreció parasitemia. Por el contrario, Rafaj et al. (2009), detectaron un descenso de aPTT, circunstancia que en seres humanos, se vincula a un riesgo incrementado de desórdenes trombóticos y mortalidad (Ten Boekel et al., 2007). Posteriormente, Rafaj et al. (2013) describieron que, durante la babesiosis en perros, se induce un estado pro-inflamatorio, que induce disfunción endotelial y actividad hemostática incrementada. Además, estos autores concluyeron que, aunque es claramente beneficioso para el parásito, las células rojas secuestradas, pueden obstruir el flujo sanguíneo en los pequeños capilares, circunstancia que al promover un estado inflamatorio, incrementa aún más la severidad de la enfermedad.

También en perros con babesiosis, Ruiz de Gopegui et al. (2011) documentaron alteraciones en el perfil hemostático, involucrando a la hemostasis primaria (trombocitopenia), a la coagulación secundaria (incremento de los tiempos de aPTT, TPT y tiempo de trombina, TT), a la concentración de FIB y a la fibrinólisis (elevación de la concentración de D-dímeros). Los mecanismos de acción propuestos por estos autores

fueron una APR, con activación de la coagulación y una lesión endotelial, derivada de la hemólisis y de la interacción de los eritrocitos parasitados con la pared del vaso sanguíneo (Ruiz de Gopegui et al., 2011).

9.4. MATERIAL Y MÉTODOS

9.4.1. Caballos

En este estudio se han incluido 33 caballos Pura Raza Española (PRE), pertenecientes a una misma ganadería, divididos en dos grupos (caballos positivos a *Theileria equi*, con sintomatología asociada al parásito, n = 23; y controles, n = 10). La finca se encuentra ubicada en Córdoba, en el sur de España, donde existe una alta prevalencia de piroplasmosis equina (García-Bocanegra et al., 2013).

Los criterios de selección de los caballos enfermos para ser incluidos en el estudio fueron los siguientes: 1) tener signos clínicos compatibles con piroplasmosis (De Waal, 1992; Camacho et al., 2005); 2) que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fuera positiva para *Theileria equi*; 3) ser PCR negativo a *Anaplasma phagocytophilum* y *Babesia caballi*. La técnica de PCR de theileriosis se hizo según el procedimiento descrito por Kim et al., (2008).

Los 23 caballos enfermos (grupo T, *Theileria*), se subdividieron en dos grupos. El grupo A (grupo T-A) estuvo formado por 16 yeguas que se mantuvieron en pastoreo (edad media: 8,50±4,50 años) y el grupo T-B estuvo integrado por 7 machos que estaban estabulados (edad media: 4,71±1,11 años). La diferente edad de ambos grupos se relacionó con el tipo de actividad que estaban llevando a cabo. Las hembras eran utilizadas para la reproducción y los machos para la cría (sementales; n = 2) y para la doma (n = 5), en entrenamiento activo en el momento del estudio.

En relación a los caballos del grupo control (C), también se dividieron en dos grupos: control C-A, formado por 5 hembras en pastoreo (edad media: 6,32±2,32 años) y control C-B constituido por 5 machos mantenidos en estabulación y también en entrenamiento (edad media: 6,43±1,24 años). Los criterios seguidos para seleccionar los caballos del grupo control fueron los siguientes: 1) ausencia de signos clínicos de enfermedad; 2) la PCR fue realizada en 7 de los 10 caballos y fueron negativos para *Theileria equi*, *Babesia caballi*, *Anaplasma phagocytophilum*.

Para controlar las garrapatas, las hembras en pastoreo fueron pulverizadas con cipermetrina¹ cuando se observaron garrapatas y se usaron compuestos fenólicos² para las cuadras de los machos estabulados. Los caballos enfermos (grupos T-A y T-B) fueron tratados con dipropionato de imidocarb³ a dosis de 4,0 mg/Kg IM, cada 72 h en un total de 4-5 tratamientos y oxitetraciclina IV, cada 12 h, 6,6 mg/kg, durante 5-7 días. Se realizaron los exámenes clínicos y se tomaron las muestras de sangre antes de iniciar el tratamiento.

9.4.2. Examen clínico

Se realizó el examen clínico en todos los animales, tantos en el grupo T como en el C. Se midieron los siguientes parámetros: frecuencia cardíaca (FC, latidos/minuto, lat/min), frecuencia respiratoria (FR, respiraciones/min, resp/min) y temperatura rectal (TR, °C). Además, se registró la presencia o ausencia de los siguientes signos clínicos: depresión, anorexia o cambios en el apetito, edema, mucosas anémicas, ictericia, hemorragias petequiales, quemosis, resistencia a moverse, cólico, hemoglobinuria y otros signos clínicos (aborto, fatiga o intolerancia al ejercicio, pérdida de peso o pérdida de la condición corporal...). Los exámenes clínicos se hicieron en el momento del diagnóstico clínico, siempre antes del tratamiento y por el mismo clínico (R.R.G-M.).

9.4.3. Obtención y procesamiento de las muestras sanguíneas

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular, la cual fue introducida en tubos con EDTA⁴, heparina, citrato y tubos sin anticoagulante. Los tubos con EDTA se utilizaron para el examen hematológico y para la medición de proteínas plasmáticas totales (PPT) y los tubos de heparina para la determinación del fibrinógeno (FIB). Los tubos con citrato se emplearon para medir el tiempo de protrombina (TPT) y el tiempo parcial de

¹ Barricade®, Zoetis AR

² Zotal®

³ Imizol®, Shering-Plough

⁴ Tubos Tapval®

tromboplastina activada (aPTT). Los tubos sin anticoagulante se utilizaron para las determinaciones bioquímicas séricas y para la concentración de los marcadores de inflamación, con excepción de FIB.

Unos 20-30 min tras la extracción de sangre, se procedió a la centrifugación de los tubos sin anticoagulante, para obtener suero, el cual fue transvasado e introducido en un tubo. Este tubo, así como los tubos con EDTA, heparina y citrato, se protegieron de la luz y se mantuvieron y transportaron refrigerados hasta el laboratorio. Los parámetros hematológicos, bioquímicos sanguíneos y las pruebas de coagulación sanguínea se midieron dentro de las 6-8 h tras la extracción sanguínea. Las muestras de suero para las concentraciones de APPs fueron congeladas a -80°C hasta su posterior análisis.

9.4.4. Parámetros hematológicos

En sangre con EDTA, se midieron los siguientes parámetros: número de glóbulos rojos (GR), concentración de hemoglobina (HB), valor hematócrito (HTO), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), número total de glóbulos blancos (GB), número de neutrófilos (NEU), linfocitos (LINF), monocitos (MON), eosinófilos (EOS) y plaquetas (PLT). Para ello se empleó un analizador automático basado en citometría de flujo láser⁵. La concentración de proteínas plasmáticas totales (PPT) se midió con refractometría de inversión⁶.

9.4.5. Parámetros bioquímicos séricos

Se han cuantificado las concentraciones séricas de bilirrubina total (BIL), glucosa (GLU), urea (BUN), creatinina (CREAT), albúmina (ALB), calcio (Ca), fósforo (P) y

⁵Analizador hematológico LaserCyte, Idexx Laboratories Inc, Westbrook, Maine, USA

⁶Refractómetro Atago, Tokyo, Japon

magnesio (Mg) y las actividades de las enzimas creatinín kinasa (CK), aspartato aminotransferasa (AST), lactato deshidrogenasa (LDH), fosfatasa alcalina (ALP) y γ -glutamil transferasa (GGT) mediante espectrofotometría⁷, utilizando reactivos específicos⁸.

9.4.6. Perfil hemostático

En plasma citratado se midió el tiempo de protrombina (TPT) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), mediante un coagulómetro⁹. La determinación del TPT se basó en el uso de tromboplastina de calcio para cuantificar el tiempo de coagulación del paciente, en comparación con un estándar¹⁰. La prueba de medición de aPTT comenzó con la adición de cefalina y suspensión de caolín, como activadores. Tras un periodo de incubación de las muestras de 3 minutos de duración, se procedió a la medición de los factores de coagulación XII y XI. A continuación y mediante la adición de cloruro de calcio, se activó el sistema intrínseco de coagulación, dando lugar a la formación de fibrina. Se midió el tiempo entre la adición de cloruro de calcio y la formación de un coágulo de fibrina.

9.4.7. Proteínas de fase aguda y metabolismo férrico

Las concentraciones séricas de amiloide A (SAA) en suero se determinaron por un método inmunturbidimétrico, previamente validado para caballos¹¹ (Jacobsen et al., 2006 a,b). La proteína C reactiva (CRP) y la haptoglobina (Hp) se midieron mediante técnicas ELISA¹². La capacidad libre (o latente) de transporte del hierro (UIBC, '*unsaturated iron binding capacity*') y la concentración sérica de hierro (Fe) se cuantificaron mediante un

⁷ Biosystems, modelo A-15, Barcelona, España

⁸ Reactivos Biosystems, Barcelona, España

⁹ Coagulómetro Ameling KC-1A, Laboratorio Grifols, Barcelona, España

¹⁰ Neoplastine Ci Plus, Laboratorios Roche, Madrid, España

¹¹ SAA Eiken Chemical Co., Tokyo, Japón

¹² Tridelta Development LTD, Maynooth, Leinster, Irlanda

analizador automático¹³, utilizando kits comerciales. Las concentraciones de FIB se midieron con el método de precipitación de calor (Tamzali et al., 2001). Para ello, se llenaron de sangre con heparina dos tubos de microhematócrito, los cuales fueron centrifugados durante 5 min en una microcentrífuga¹⁴. En uno de ellos, se midió la concentración de PPT mediante refractometría¹⁵. El segundo tubo de microhematócrito se calentó a 57°C durante 3 min, y al cabo de este tiempo, se midieron las PPT. La diferencia de medición entre ambos tubos, representó la concentración de FIB X100.

Todos los análisis demostraron unos límites de imprecisión inferiores a 5%.

9.4.8. Análisis estadístico

En primer lugar, se comprobó la normalidad de las variables estudiadas mediante una prueba de Shapiro. Muchos de los parámetros determinados, no se ajustaron a una distribución normal (en el grupo T, *Theileria*: HB, MON, NEU, Mg, CK, ALP, PPT, aPPT, CRP y SAA; en el grupo C, control: FR, LINF, P, SAA y FIB). Por ello, los datos se presentan como medianas y percentiles (25-75%). Además, las diferencias entre grupos se han evaluado mediante tests no paramétricos.

De este modo, las diferencias entre los dos grupos control (C-A y C-B), se evaluaron mediante un test de Mann-Whitney. En aquellos casos en los cuales no se encontraron diferencias en ambos subgrupos, todos los datos se procesaron de forma conjunta, considerando un único grupo control. De igual modo, las diferencias entre los grupos C y T, así como entre los dos subgrupos del grupo T (T-A y T-B) se analizaron mediante un test de Mann-Whitney.

Las correlaciones entre los parámetros clínicos y laboratoriales en los caballos del grupo T se determinaron mediante una prueba de correlación por rangos de Spearman.

¹³Olympus Chemistry Analyzer, Olympus

¹⁴Microcentrífuga Orto Alresa Biocen 22

¹⁵Refractómetro Atago, Tokyo, Japon

Se detectaron tres yeguas, pertenecientes al grupo T-A con los valores más elevados de tres APPs (SAA, Hp y FIB). Las características clínicas y laboratoriales de estos tres animales se compararon con el resto de animales provenientes del grupo T-A mediante un test de Mann-Whitney.

El nivel de significación se fijó a nivel de $p < 0,05$. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante dos programas específicos^{16 17}.

¹⁶Statistica for Windows v. 9.0

¹⁷ Statgraphics Centurion XVI.I for windows

9.5. RESULTADOS

9.5.1. Examen clínico

Los porcentajes de los caballos de los grupos A y B con los diferentes signos clínicos se presentan en la tabla 1.

TABLA 1. Porcentajes de síntomas observados en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación)

Síntomas clínicos	Grupo T-A (n=16)	Grupo T-B (n=7)
Depresión	50% (8/16)	57,14% (4/7)
Anorexia o cambios de apetito	93,75 % (15/16)	28,57% (2/7)
Edema en los miembros	18,75% (3/16)	42,86% (3/7)
Edema en la parte ventral del tórax o abdomen	18,75% (3/16)	14,29% (1/7)
Mucosas pálidas	81,25% (13/16)	42,86% (3/7)
Ictericia	50% (8/16)	14,29% (1/7)
Quemosis	18,75% (3/16)	0% (0/7)
Petequias	0% (0/16)	0% (0/7)
Reluctancia al movimiento	6,25% (1/16)	0% (0/7)
Decúbito	0% (0/16)	0% (0/7)
Otros síntomas clínicos		
Pérdida de peso	18,75% (3/16)	14,29% (1/7)
Pérdida de rendimiento- incapacidad para entrenamiento		71,43% (5/7)

Los signos clínicos más comunes que se encontraron en el grupo T-A fueron anorexia o cambios de apetito y mucosas pálidas, seguidas por ictericia y depresión. En el grupo T-B, los dos signos clínicos predominantes fueron pérdida de rendimiento e incapacidad para entrenar y depresión.

Los datos de la exploración clínica se recogen en la tabla 2. No se han encontrado diferencias entre los grupos C-A y C-B, por lo que se han presentado los datos conjuntos para este grupo.

TABLA 2. Parámetros clínicos en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control)

(TR, temperatura rectal; FC, frecuencia cardiaca; FR, frecuencia respiratoria)

C: diferencias con el grupo control, $p < 0,05$.

Parámetro y unidad	Grupo T-A (n=16)	Grupo T-B (n=7)	Grupo C (n=10)
TR (°C)	37,6 (37,5-37,8)	37,4 (37,3-37,7)	37,30 (37,2-37,4)
FC (lat/min)	40,5 (39,0-41,0)	40,0 (40,0-42,0)	40,0 (38,0-40,0)
FR (resp/min)	20,5 (19,0-21,0) C	19,0 (18,0-20,0) C	14,0 (12,0-16,0)

Ninguno de los caballos tenía fiebre en el momento del examen clínico. Se encontró que caballos T-A y T-B tenían valores superiores de FR que los controles.

9.5.2. Análisis hematológico

No se han detectado diferencias entre los grupos C-A y C-B en ninguno de los parámetros hematológicos, por lo que se muestran los valores conjuntos para todos los animales de dichos grupos. Los resultados del eritrograma se presentan en la tabla 3. En comparación con el grupo C, los caballos del grupo T-A, tuvieron valores significativamente inferiores de GR, HB y HTO y superiores de VCM, HCM y CHCM. Por otro lado, los caballos del grupo T-B presentaron un HTO inferior al grupo control. Las únicas diferencias entre los grupos T-A y T-B fueron los valores inferiores de HTO y superiores de HCM en el grupo T-A (Tabla 3).

TABLA 3. Parámetros eritrocitarios en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control) (GR, glóbulos rojos; HB, concentración de hemoglobina; HTO, valor hematócrito; VCM, volumen corpuscular medio; HCM, hemoglobina corpuscular media; CHCM, concentración de hemoglobina corpuscular media).

Las letras indican diferencias entre grupos, $p < 0,05$.

Parámetro y unidad	Grupo T-A (n=16)	Grupo T-B (n=7)	Grupo C (n=10)
GR (10⁶/μl)	7,46 (6,28-7,90) C	8,28 (7,59-8,39)	8,76 (8,05-9,80)
HB (g/dl)	11,9 (11,7-12,3) C	12,8 (12,3-13,4)	12,9 (12,4-15,3)
HTO (%)	32,9 (31,5-33,0) BC	36,7 (35,9-37,7) C	43,4 (39,9-44,8)
VCM (fl)	51,6 (49,7-53,0) C	47,6 (46,1-49,4)	47,0 (45,5-49,4)
HCM (g/dl)	17,7 (16,7-18,8) BC	15,5 (15,3-16,3)	15,5 (13,0-15,8)
CHCM (%)	34,1 (32,8-35,6) C	33,2 (32,1-34,1)	32,4 (31,5-32,9)

En la tabla 4 se recopilan los datos correspondientes al leucograma, considerando un solo grupo control, al no hallar diferencias significativas entre grupos C-A y C-B. Los caballos del grupo T-B tuvieron un número superior de LINF en comparación con los otros dos grupos, T-A y C. No se detectaron diferencias entre grupos en los siguientes parámetros: GB, NEU, MON y EOS.

TABLA 4. Parámetros leucocitarios en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control)
(GB, glóbulos blancos; NEU, neutrófilos, LINF, linfocitos; MON, monocitos; EOS, eosinófilos)

Las letras indican diferencias entre grupos, $p < 0,05$.

Parámetro y unidad	Grupo T-A (n=16)	Grupo T-B (n=7)	Grupo C (n=10)
GB ($10^3/\mu\text{l}$)	9,33 (8,06-11,3)	10,42 (8,7-13,80)	8,15 (6,8-9,4)
NEU ($10^3/\mu\text{l}$)	4,56 (3,86-5,73)	4,30 (3,31-5,88)	4,17 (3,78-5,25)
LINF ($10^3/\mu\text{l}$)	2,98 (2,34-4,09) B	5,55 (3,20-6,37) C	2,05 (1,93-2,58)
MON ($10^3/\mu\text{l}$)	0,54 (0,48-0,66)	0,57 (0,52-0,73)	0,48 (0,39-0,67)
EOS ($10^3/\mu\text{l}$)	0,77 (0,56-0,93)	0,65 (0,46-0,72)	0,62 (0,40-0,89)

9.5.3. Análisis bioquímico

En la tabla 5 se recogen las diferencias entre grupos para los parámetros bioquímicos, poniendo un único grupo control, al no haberse detectado diferencias significativas entre los grupos C-A y C-B. Los caballos del grupo T-A tuvieron valores superiores de BIL en comparación con los otros 2 grupos y niveles inferiores de AST en comparación con el grupo C. Los caballos del grupo T-B presentaron datos significativamente superiores de CREAT y LDH frente al grupo C. Finalmente, en cuanto a la diferencia entre los grupos de caballos positivos a *Theileria equi*, se han encontrado diferencias en BIL (valores superiores en el grupo T-A) y en CREAT (valores superiores en el grupo T-B) (Tabla 5).

TABLA 5. Parámetros bioquímicos séricos en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control)

(*BIL*, bilirrubina total; *GLU*, glucosa; *BUN*, nitrógeno ureico en sangre; *CREAT*, creatinina; *PPT*, proteínas plasmáticas totales; *ALB*, albúmina; *Ca*, calcio; *P*, fósforo; *Mg*, magnesio; *CK*, creatín kinasa; *AST*, aspartato aminotransferasa; *LDH*, lactato deshidrogenasa; *ALP*, fosfatasa alcalina; *GGT*, γ -glutamil transferasa)

Las letras indican diferencias entre grupos, $p < 0,05$.

Parámetro y unidad	Grupo T-A (n=16)	Grupo T-B (n=7)	Grupo C (n=10)
BIL (mg/dl)	3,0 (2,35-3,25) B,C	1,4 (1,1-2,2)	1,1 (1,0-1,2)
GLU (mg/dl)	102,5 (95-118,5)	121,0 (112-123)	103,5 (102-105)
BUN (mg/dl)	33,0 (30-43,5)	35,0 (31-39)	34,0 (33,0-36,0)
CREAT (mg/dl)	1,35 (1,15-1,55) B	2,0 (1,7-2,2) C	1,2 (1,1-1,3)
PPT (g/dl)	6,95 (6,6-7,2)	7,2 (6,6-7,4)	6,85 (6,5-7,0)
ALB (g/dl)	3,1 (3,0-3,15)	3,3 (3,2-3,5)	3,1 (2,9-3,4)
Ca (mg/dl)	12,8 (11,7-13,7)	11,8 (11,0-12,3)	12,2 (10,5-13,2)
P (mg/dl)	3,2 (2,9-3,8) C	3,0 (2,0-3,3)	2,25 (2,1-2,9)
Mg (mg/dl)	2,15 (1,85-2,45)	2,4 (2,0-2,8)	2,65 (2,2-3,0)
CK (UI/l)	201,5 (174-223)	229,0 (205-254)	254,5 (220-314)
AST (UI/l)	220 (186,5-242,5) C	256 (247-265)	266 (249-284)
LDH (UI/l)	1001 (907,5-1088,5)	1072 (1018-1229) C	798,5 (701-975)
ALP (UI/l)	186,0 (155,0-227,5)	185 (136-209)	211,5 (150-262)
GGT (UI/l)	12,5 (9,1-16,0)	13 (9-13)	11,5 (10-14)

9.5.4. Perfil de coagulación

En la tabla 6 se recopilan los tres parámetros del perfil de coagulación. De igual modo que en los parámetros anteriormente presentados, no han existido diferencias significativas entre los dos grupos control. Por otro lado, el TPT fue significativamente

superior en el grupo T-A que en el C. Se ha visto que, los caballos del grupo T-B tuvieron valores muy bajos de PLT, inferiores a los otros grupos y a los valores de referencia para la especie equina (Lassen y Swardson, 1995; Muñoz et al., 2012). Además, el grupo T-A mostró datos inferiores de PLT en comparación con el grupo control.

TABLA 6. Perfil de coagulación en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control)
(PLT, plaquetas; TPT, tiempo de protrombina; aPTT, tiempo de tromboplastina parcial activada)

Las letras indican diferencias entre grupos, $p < 0,05$.

Parámetro y unidad	Grupo T-A (n=16)	Grupo T-B (n=7)	Grupo C (n=10)
PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	136,5 (114,5-160,0) BC	87,0 (72,0-113,0) C	184,5 (153,0-192,0)
TPT (s)	11,2 (10,5-11,9) C	10,4 (9,7-10,9)	9,40 (8,9-9,9)
aPTT (s)	46,1 (43,2-49,1)	43,4 (42,9-48,8)	47,2 (45,1-49,4)

9.5.5. Proteínas de fase aguda y otros marcadores de inflamación

No se han encontrado diferencias significativas entre los grupos C-A y C-B, por lo que todos los datos del grupo control se presentan de forma conjunta. En las tablas 7 a la 13 se muestran las medianas y percentiles de las concentraciones de las proteínas de fase aguda y marcadores de inflamación. Debido a que se ha encontrado una gran variabilidad interindividual, además se presentan los valores máximos y mínimos para cada uno de los parámetros.

Aunque no existieron diferencias significativas en la concentración de SSA, se puede apreciar que los valores máximos en el grupo A son muy elevados, llegando hasta los 308 mg/dl. Sin embargo, en los otros animales de los grupos T-B y C, los valores máximos fueron de 0,480 mg/dl y 0,60 mg/dl, respectivamente (Tabla 7).

TABLA 7. Concentraciones de amiloide sérico, SAA, en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control)

Las letras indican diferencias entre grupos, $p < 0,05$.

Parámetro y unidad	Grupo T-A (n=16)	Grupo T-B (n=7)	Grupo C (n=10)
Mediana (mg/dl)	0,480	0,480	0,480
25-75% percentiles	0,480-0,490	0,480-0,480	0,480-0,500
Mín-máx	0,480- 308,0	0,480-0,480	0,480-0,600

Las concentraciones de CRP se presentan en la tabla 8. Los caballos del grupo T-A tuvieron valores superiores significativamente para esta APP en comparación con los otros dos grupos.

TABLA 8. Concentraciones de proteína C reactiva, CRP, en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control)

Las letras indican diferencias entre grupos, $p < 0,05$.

Parámetro y unidad	Grupo T-A (n=16)	Grupo T-B (n=7)	Grupo C (n=10)
Mediana ($\mu\text{g/dl}$)	36,30 BC	28,50	27,15
25-75% percentiles	28,25-52,85	25,0-34,5	22,8-33,8
Mín-máx	22,80- 185,9	24,1-40,2	14,9-50,0

En la tabla 9 se muestran las concentraciones de Hp. Aunque no ha alcanzando la significación estadística, esta tabla muestra que, algunos caballos de los grupos T-A y T-B presentaron valores de Hp superiores a los del grupo control.

TABLA 9. Concentraciones de haptoglobina, Hp, en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control)

Las letras indican diferencias entre grupos, $p < 0,05$.

Parámetro y unidad	Grupo T-A (n=16)	Grupo T-B (n=7)	Grupo C (n=10)
Mediana (mg/dl)	2,041	2,128	1,340
25-75% percentiles	1,205-2,866	1,954-2,919	1,040-2,030
Mín-máx	0,323- 3,259	0,987- 3,564	0,200-2,450

A continuación se muestran los valores de FIB, y tampoco han existido diferencias significativas entre los tres grupos. No obstante, el valor máximo correspondió a animales del grupo T-A (Tabla 10).

TABLA 10. Concentraciones de fibrinógeno, FIB, en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control)

Las letras indican diferencias entre grupos, $p < 0,05$.

Parámetro y unidad	Grupo T-A (n=16)	Grupo T-B (n=7)	Grupo C (n=10)
Mediana (mg/dl)	400	300	300
25-75% percentiles	250-400	200-400	300-300
Mín-máx	200- 600	100-500	100-500

En cuando a las concentraciones séricas de Fe, no se apreciaron diferencias entre los tres grupos. Además, como se puede apreciar en la tabla 11, los animales del grupo T-A mostraron la concentración más baja (44,0 $\mu\text{g/dl}$), mientras que el valor máximo correspondió a un animal del grupo control (385,0 $\mu\text{g/dl}$) (Tabla 11).

TABLA 11. Concentraciones de hierro, Fe, en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control)

Las letras indican diferencias entre grupos, $p < 0,05$.

Parámetro y unidad	Grupo T-A (n=16)	Grupo T-B (n=7)	Grupo C (n=10)
Mediana (µg/dl)	153,0	159,0	313,5
25-75% percentiles	132,0-178,0	135,0-186,0	220,0-346,0
Mín-máx	44,0 -261,0	129,0-217,0	182,0-385,0

En la tabla 12 se presentan las concentraciones de FERR. En este parámetro, no se han encontrado diferencias significativas entre grupos, si bien el valor máximo observado perteneció a una yegua del grupo T-A (Tabla 12).

TABLA 12. Concentraciones de ferritina, FERR, en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control)

Las letras indican diferencias entre grupos, $p < 0,05$.

Parámetro y unidad	Grupo T-A (n=16)	Grupo T-B (n=7)	Grupo C (n=10)
Mediana (ng/dl)	10,0	10,0	10,0
25-75% percentiles	10,0-10,0	10,0-10,0	10,0-10,0
Mín-máx	10,0- 43,8	10,0-10,0	10,0-11,9

Las concentraciones de UIBC se muestran en la tabla 13. Los valores encontrados en el grupo T-A fueron significativamente superiores al grupo control.

TABLA 13. Concentraciones de la capacidad de unión del Fe no saturado, UIBC, en caballos PRE positivos a *Theileria equi* (grupo T-A, hembras en pastoreo; grupo T-B, machos en estabulación; Grupo C, control)

Las letras indican diferencias entre grupos, $p < 0,05$.

Parámetro y unidad	Grupo T-A (n=16)	Grupo T-B (n=7)	Grupo C (n=10)
Mediana (µg/dl)	252,1 C	239,7	209,2
25-75% percentiles	212,7-286,4	186,0-261,0	194,3-221,4
Mín-máx	193,2-360,5	184,8-291,3	185,0-367,4

Como se ha comentado con anterioridad, algunos animales mostraron valores elevados de varias APPs, concretamente de SSA, Hp y FIB, en comparación con el resto del colectivo. Tomando en consideración los valores de referencia de estas APPs para la especie equina, el número de caballos que tuvieron datos superiores dentro de cada grupo se presenta en la tabla 14. Como se puede observar, todos los animales del grupo control tuvieron valores de APPs dentro de los valores normales.

TABLA 14. Número y porcentaje de caballos PRE positivos a *Theileria equi* con valores de APPs superiores a los límites de referencia para la especie equina¹⁸

Parámetro y unidad	Grupo T-A (n=16)	Grupo T-B (n=7)	Grupo C (n=10)
SAA > 10 mg/l	4/16 (18,75%)	0/7 (0%)	0/10 (0%)
Hp > 3 mg/l	4/16 (25%)	1/7 (14,29%)	0/10 (0%)
FIB > 400 mg/dl	3/16 (18,59%)	1/7 (14,29%)	0/10 (0%)

A continuación, se presentan los valores obtenidos en estos tres animales en comparación con el resto de caballos de su mismo grupo, el T-A. En la tabla 15, se muestran

¹⁸Valores de referencia proporcionados por el Laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia

los datos correspondientes a los parámetros de la exploración clínica, donde se puede evidenciar la ausencia de diferencias significativas.

TABLA 15. Parámetros clínicos en tres yeguas del grupo T-A con concentraciones elevadas de APPs, en comparación con el resto de yeguas del grupo T-A

(TR, temperatura rectal; FC, frecuencia cardiaca; FR, frecuencia respiratoria)

Parámetro y unidad	Grupo T-A con APPs elevadas (n=3)	Grupo T-A con APPs normales (n=13)
TR (°C)	37,40 (37,40-37,90)	37,60 (37,50-37,70)
FC (lat/min)	41,00 (40,00-42,00)	40,00 (39,00-41,00)
FR (resp/min)	19,00 (19,00-24,00)	21,00 (19,00-21,00)

En cuanto a los datos del eritrograma, no se han encontrado diferencias, si bien se observó una tendencia no significativa hacia valores inferiores de GR y de HCM en las yeguas con APPs fuera del rango de referencia (Tabla 16).

TABLA 16. Parámetros eritrocitarios en tres yeguas del grupo T-A con concentraciones elevadas de APPs, en comparación con el resto de yeguas del grupo T-A

(GR, glóbulos rojos; HB, concentración de hemoglobina; HTO, valor hematócrito; VCM, volumen corpuscular medio; HCM, hemoglobina corpuscular media; CHCM, concentración de hemoglobina corpuscular media).

Parámetro y unidad	Grupo T-A con APPs elevadas (n=3)	Grupo T-A con APPs normales (n=13)
GR (10⁶/μl)	6,560 (6,450-8,550)	7,570 (6,110-7,830)
HB (g/dl)	11,90 (11,80-12,60)	12,00 (11,60-12,10)
HTO (%)	31,00 (31,00-33,00)	33,00 (32,00-33,00)
VCM (fl)	51,50 (46,00-52,00)	51,70 (50,10-53,10)
HCM (g/dl)	16,10 (15,00-18,00)	18,40 (17,00-18,90)
CHCM (%)	32,60 (30,80-34,90)	34,20 (33,20-35,60)

En la tabla 17, se muestran los valores del leucograma para los dos grupos de caballos en los que se ha subdividido el grupo T-A en función de sus niveles de APPs. Como se puede evidenciar, las yeguas del grupo T-A con valores elevados de APPs tuvieron números superiores de NEU (Tabla 17).

TABLA 17. Parámetros leucocitarios en tres yeguas del grupo T-A con concentraciones elevadas de APPs, en comparación con el resto de yeguas del grupo T-A

(GB, glóbulos blancos; NEU, neutrófilos, LINF, linfocitos; MON, monocitos; EOS, eosinófilos)

* Diferencias entre grupos, $p < 0,05$.

Parámetro y unidad	Grupo T-A con APPs elevadas (n=3)	Grupo T-A con APPs normales (n=13)
GB ($10^3/\mu\text{l}$)	13,34 (9,050-13,36)	9,240 (7,540-9,690)
NEU ($10^3/\mu\text{l}$)	6,500 (5,050-9,500)*	4,350 (3,770-4,750)
LINF ($10^3/\mu\text{l}$)	3,090 (2,530-5,230)	2,870 (2,210-4,060)
MON ($10^3/\mu\text{l}$)	0,500 (0,450-1,030)	0,540 (0,500-0,560)
EOS ($10^3/\mu\text{l}$)	0,450 (0,250-1,060)	0,790 (0,680-0,920)

En relación a los parámetros bioquímicos, en la tabla 18, no se han encontrado diferencias significativas, si bien cabe destacar la tendencia hacia valores más elevados de GLU, BUN y ALP en las yeguas del grupo T-A con APPs elevadas.

TABLA 18. Bioquímica sérica en tres yeguas del grupo T-A con concentraciones elevadas APPs, en comparación con el resto de yeguas del grupo T-A

(*BIL*, bilirrubina total; *GLU*, glucosa; *BUN*, nitrógeno ureico en sangre; *CREAT*, creatinina; *PPT*, proteínas plasmáticas totales; *ALB*, albúmina; *Ca*, calcio; *P*, fósforo; *Mg*, magnesio; *CK*, creatín kinasa; *AST*, aspartato aminotransferasa; *LDH*, lactato deshidrogenasa; *ALP*, fosfatasa alcalina; *GGT*, γ -glutamil transferasa)

Parámetro y unidad	Grupo T-A con APPs elevadas (n=3)	Grupo T-A con APPs normales (n=13)
BIL (mg/dl)	3,00 (2,20-3,40)	3,00 (2,40-3,20)
GLU (mg/dl)	113,0 (106-128)	98,0 (93,0-115)
BUN (mg/dl)	49,0 (33,0-49,0)	33,0 (29,0-40,0)
CREAT (mg/dl)	1,30 (1,30-1,70)	1,40 (1,10-1,50)
PPT (g/dl)	6,90 (6,80-7,10)	7,00 (6,70-7,20)
ALB (g/dl)	3,20 (3,00-3,20)	3,10 (3,00-3,10)
Ca (mg/dl)	12,70 (10,40-14,00)	12,90 (11,70-13,60)
P (mg/dl)	3,70 (3,00-4,30)	3,20 (2,80-3,70)
Mg (mg/dl)	2,00 (1,50-3,80)	2,20 (1,90-2,40)
CK (UI/l)	222,0 (166,0-278,0)	201,0 (182,0-220,0)
AST (UI/l)	228,0 (176,0-306,0)	217,0 (197,0-229,0)
LDH (UI/l)	1133 (999,0-1320)	1000 (902,0-1036)
ALP (UI/l)	284,0 (138,0-310,0)	189,0 (157,0-229,0)
GGT (UI/l)	12,0 (8,40-12,0)	13,0 (9,20-16,0)

No se han hallado diferencias en el perfil de coagulación como se muestra en la tabla 19.

TABLA 19. Perfil de coagulación en tres yeguas del grupo T-A con concentraciones elevadas de APPs, en comparación con el resto de yeguas del grupo T-A

(*PLT*, plaquetas; *TPT*, tiempo de protrombina; *aPTT*, tiempo de tromboplastina parcial activada)

Parámetro y unidad	Grupo T-A con APPs elevadas (n=3)	Grupo T-A con APPs normales (n=13)
PLT (10³/μl)	141,0 (103,0-154,0)	132,0 (117,0-154,0)
TPT (s)	10,40 (10,10-11,00)	11,70 (10,70-11,90)
aPTT (s)	43,30 (41,90-54,10)	47,00 (43,60-48,40)

Finalmente, en la tabla 20, se muestran las diferencias en las concentraciones de APPs. Como el criterio de separación entre grupos eran los valores superiores de las principales APPs, SSA, Hp y FIB, las concentraciones de dichas APPs fueron lógicamente más altas. Además, se ha encontrado que, las yeguas con valores más elevados de estas APPs, se caracterizaron por concentraciones inferiores de Fe y superiores de UIBC.

TABLA 20. Proteínas de fase aguda y marcadores de inflamación en tres yeguas del grupo T-A con concentraciones elevadas de APPs, en comparación con el resto de yeguas del grupo T-A

(SAA, amiloide sérico A; CRP, proteína C reactiva; Hp, haptoglobina; FIB, fibrinógeno; Fe, hierro; FERR, ferritina; UIBC, capacidad de unión al Fe no saturado)

* Diferencias entre grupos, $p < 0,05$.

Parámetro y unidad	Grupo T-A con APPs elevadas (n=3)	Grupo T-A con APPs normales (n=13)
SAA (mg/dl)	136,2 (0,480-308,0) *	0,480 (0,480-0,480)
CRP (µg/dl)	130,2 (56,40-187,0) *	31,70 (27,60-38,80)
Hp (mg/dl)	3,173 (2,318-3,259) *	1,336 (1,171-2,598)
FIB (mg/dl)	400,0 (400,0-400,0) *	300,0 (200,0-400,0)
Fe (µg/dl)	113,0 (44,00-177,0) *	160,0 (144,0-179,0)
FERR (ng/dl)	5,000 (5,000-43,80)	4,600 (2,100-6,000)
UIBC (µg/dl)	350,7 (265,6-360,5) *	244,2 (207,6-270,8)

9.5.6. Correlaciones entre parámetros clínicos, hematológicos, bioquímicos séricos y proteínas de fase aguda y marcadores de inflamación

Las correlaciones de los diversos parámetros estudiados (clínicos, hematológicos y bioquímicos séricos), con las concentraciones de APPs y los marcadores de inflamación se muestran en las tablas 21 a 26. Como se puede evidenciar, el SAA estuvo positivamente correlacionado con la actividad ALP (0,492) y negativamente, con HTO (-0,444) y con Fe (-0,499). Las concentraciones de CRP tuvieron correlaciones positivas con aPTT (0,430) y con UIBC (0,446) y negativas con GR (-0,419), LINF (-0,454) y Fe (-0,411). La Hp presentó correlaciones significativas positivas con tres parámetros, GLU (0,485), LDH (0,406) y UIBC (0,474) y negativas con HCM (-0,452). Las concentraciones de FIB estuvieron correlacionadas con TPT (0,472) y Fe (-0,417). Las concentraciones de Fe

mostraron numerosas correlaciones significativas, negativas con PLT (-0,450), NEU (-0,543), TPT (-0,501), BIL (-0,528), CREAT (-0,427), CK (-0,411), AST (-0,530), LDH (-0,478). La FERR estuvo correlacionada positivamente con PLT (0,619) y de forma negativa con GR (-0,501), LINF (-0,453), GLU (-0,427), LDH (-0,460). Finalmente, se observó una correlación significativa negativa entre Fe y UIBC (-0,401) (Tablas 21 a 26).

TABLA 21. Coeficientes de correlación entre los parámetros clínicos y las concentraciones de proteínas de fase aguda y marcadores de inflamación en caballos PRE positivos a *Theileria equi*

(SAA, amiloide sérico A; CRP, proteína C reactiva; Hp, haptoglobina; FIB, fibrinógeno; Fe, hierro; FERR, ferritina; UIBC, capacidad de unión al Fe no saturado; TR, temperatura rectal; FC, frecuencia cardiaca; FR, frecuencia respiratoria)

	SAA	CRP	Hp	FIB	Fe	FERR	UIBC
TR	0,278	0,357	0,186	0,190	-0,273	0,267	0,243
FC	0,226	0,415	0,010	0,231	-0,235	0,093	0,205
FR	0,364	0,320	0,089	0,150	-0,137	0,341	0,254

TABLA 22. Coeficientes de correlación entre el eritrograma y las concentraciones de proteínas de fase aguda y marcadores de inflamación en caballos PRE positivos a *Theileria equi*

(SAA, amiloide sérico A; CRP, proteína C reactiva; Hp, haptoglobina; FIB, fibrinógeno; Fe, hierro; FERR, ferritina; UIBC, capacidad de unión al Fe no saturado; GR, glóbulos rojos; HB, hemoglobina; HTO, hematócrito; VCM, volumen corpuscular medio; HCM, hemoglobina corpuscular media; CHCM, concentración de hemoglobina corpuscular media)

Correlaciones significativas en negrita $p < 0,05$

	SAA	CRP	Hp	FIB	Fe	FERR	UIBC
GR	-0,271	-0,419	0,122	-0,103	0,124	-0,501	0,174
HB	-0,124	-0,148	0,083	-0,142	-0,301	-0,122	0,026
HTO	-0,444	0,368	0,189	0,116	0,043	0,260	0,260
VCM	0,226	0,178	-0,337	0,036	-0,099	0,287	-0,179
HCM	0,145	0,171	-0,452	0,049	0,095	0,292	-0,237
CHCM	0,076	0,153	-0,315	-0,086	0,199	0,175	-0,075

TABLA 23. Coeficientes de correlación entre el leucograma y las concentraciones de proteínas de fase aguda y marcadores de inflamación en caballos PRE positivos a *Theileria equi*.

(SAA, amiloide sérico A; CRP, proteína C reactiva; Hp, haptoglobina; FIB, fibrinógeno; Fe, hierro; FERR, ferritina; UIBC, capacidad de unión al Fe no saturado; GB, glóbulos blancos; NEU, neutrófilos; LINF, linfocitos; MON, monocitos; EOS, eosinófilos)

Correlaciones significativas en negrita $p < 0,05$

	SAA	CRP	Hp	FIB	Fe	FERR	UIBC
GB	0,119	-0,031	0,244	0,057	-0,387	-0,338	0,147
NEU	0,245	0,219	0,132	-0,029	-0,543	0,122	0,161
LINF	-0,045	-0,454	0,314	0,026	-0,284	-0,453	0,118
MON	-0,214	0,114	0,023	0,056	-0,292	-0,263	-0,012
EOS	-0,066	-0,328	-0,260	-0,026	-0,016	-0,142	-0,390

TABLA 24. Coeficientes de correlación entre los parámetros bioquímicos séricos y las concentraciones de proteínas de fase aguda y marcadores de inflamación en caballos PRE positivos a *Theileria equi*

(SAA, amiloide sérico A; CRP, proteína C reactiva; Hp, haptoglobina; FIB, fibrinógeno; Fe, hierro; FERR, ferritina; UIBC, capacidad de unión al Fe no saturado; PLT, plaquetas; TPT, tiempo de protrombina; aPTT, tiempo de tromboplastina parcial activada)

Correlaciones significativas en negrita $p < 0,05$

	SAA	CRP	Hp	FIB	Fe	FERR	UIBC
BIL	0,084	0,324	-0,022	0,176	-0,528	-0,215	0,344
GLU	-0,095	-0,201	0,485	-0,142	-0,138	-0,427	0,219
BUN	0,085	0,089	0,188	-0,093	0,085	-0,239	0,308
CREAT	-0,260	0,025	-0,132	0,028	-0,427	-0,334	-0,087
PPT	-0,112	-0,021	0,221	0,034	-0,314	-0,221	0,186
ALB	-0,061	0,017	0,239	-0,077	0,117	-0,053	0,144
Ca	0,052	0,366	0,123	0,305	0,134	0,211	0,064
P	0,055	0,142	0,107	0,295	-0,255	-0,289	0,222
Mg	-0,095	-0,154	-0,388	0,191	0,259	-0,043	-0,307
CK	0,270	-0,099	0,099	-0,034	-0,411	0,020	0,051
AST	0,172	-0,250	0,072	-0,205	-0,530	-0,097	-0,027
LDH	-0,084	0,340	0,406	0,004	-0,478	-0,460	0,229
ALP	0,492	-0,140	0,184	0,110	-0,190	-0,018	-0,033
GGT	0,142	-0,194	-0,018	0,069	-0,259	-0,071	0,072

TABLA 25. Coeficientes de correlación entre el perfil de coagulación y las concentraciones de proteínas de fase aguda y marcadores de inflamación en caballos PRE positivos a *Theileria equi*

(SAA, amiloide sérico A; CRP, proteína C reactiva; Hp, haptoglobina; FIB, fibrinógeno; Fe, hierro; FERR, ferritina; UIBC, capacidad de unión al Fe no saturado; PLT, plaquetas; TPT, tiempo de protrombina; aPTT, tiempo de tromboplastina parcial activada)

Correlaciones significativas en negrita $p < 0,05$

	SAA	CRP	Hp	FIB	Fe	FERR	UIBC
PLT	0,092	0,038	-0,310	0,071	-0,450	0,619	-0,097
TPT	-0,248	0,211	-0,001	0,472	-0,501	-0,376	0,359
aPTT	-0,282	0,430	-0,256	-0,021	0,018	-0,186	-0,008

TABLA 26. Coeficientes de correlación entre las concentraciones de proteínas de fase aguda y marcadores de inflamación en caballos PRE positivos a *Theileria equi*

(SAA, amiloide sérico A; CRP, proteína C reactiva; Hp, haptoglobina; FIB, fibrinógeno; Fe, hierro; FERR, ferritina; UIBC, capacidad de unión al Fe no saturado; Correlaciones significativas en negrita $p < 0,05$)

	SAA	CRP	Hp	FIB	Fe	FERR
CRP	0,180					
Hp	0,162	0,167				
FIB	0,001	0,296	0,001			
Fe	-0,499	-0,411	-0,202	-0,417		
FERR	0,190	0,298	-0,264	0,103	0,235	
UIBC	0,063	0,446	0,474	0,232	-0,401	-0,125

Otras correlaciones significativas que se han encontrado entre los diversos parámetros estudiados son las siguientes. En cuanto a las constantes vitales, se hallaron

correlaciones significativas entre TR y FR (0,521) y entre FR y HTO (-0,838), GR (-0,529), HTO (-0,559), BIL (0,691) y LDH (0,404).

En relación al eritrograma, se hallaron estas correlaciones significativas; GR con HB (0,508), VCM (-0,605), CHCM (-0,571), HCM (-0,751), BIL (-0,482), GLU (-0,441) y AST (-0,643); HB con HTO (0,502), BIL (-0,401), ALB (0,513), P (-0,685) y AST (0,429); HTO con VCM (-0,404), HCM (-0,407), BIL (-0,756) y P (-0,535); VCM con HCM (0,866) y BIL (0,455); HCM con CHCM ($r=0,724$) y BIL (0,537).

En cuanto a los parámetros del leucograma, se han observado estas correlaciones: GB con NEU (0,558), LINF (0,807), MON (0,667), PLT (-0,629), ALP (0,558) y LDH (0,608); LINF con MON (0,515), PLT (-0,620) y LDH (0,592) y MON con LDH (0,468).

Finalmente, y en cuanto a la bioquímica sanguínea, la correlación más elevada se observó entre ALP y AST (0,506).

9.6. DISCUSIÓN

El presente estudio analiza los signos clínicos y los parámetros hematológicos, bioquímicos sanguíneos, incluyendo perfil de coagulación, concentraciones de APPs, y otros marcadores de inflamación (Fe) en caballos PRE infectados de forma natural por *Theileria equi*, en pastoreo y en estabulación, y en comparación con grupos control. Se ha diferenciado entre caballos estabulados y en pastoreo, porque, diversos estudios han documentado que la presencia de garrapatas es un importante factor de riesgo en esta enfermedad. Por este motivo, los animales mantenidos al aire libre suelen tener mayor prevalencia serológica (Kouam et al., 2010; García-Bocanegra et al., 2013). Es lógico suponer que, estos animales, con un contacto más probable con el vector, tendrán alteraciones clínicas y laboratoriales más evidentes.

9.6.1. Examen clínico

En general, la sintomatología de ambos grupos de caballos infectados por *Theileria equi*, fue de intensidad leve. Las yeguas del grupo T-A tuvieron síntomas más evidentes, posiblemente debido a que estos animales se encontraban en pastoreo, por lo que el contacto con el vector sería más frecuente. Una segunda justificación podría ser que, como los machos del grupo T-B estaban en entrenamiento, la anemia daría lugar a pérdida de rendimiento, que se detectarían con rapidez y por tanto, el diagnóstico podría haber sido más precoz en este grupo que en las yeguas reproductoras.

En principio, no consideramos que esta diferencia entre grupos se asocie al sexo. Diversos autores han descrito que el sexo no parece ser un factor de riesgo para las infecciones por *Theileria equi* en caballos (Kouam et al., 2010; Grandi et al., 2011; Farkas et al., 2013; García-Bocanegra et al., 2013). No obstante, muchos autores indican una seroprevalencia superior en yeguas (Sevinc et al., 2008; Kouam et al., 2010). Posiblemente, en estos estudios, la seroprevalencia más elevada en yeguas y en nuestro caso, la sintomatología más evidente, fueron consecuencia de las prácticas de manejo. En general,

existe un control más estricto de la exposición a garrapatas en animales estabulados. Es una práctica común en yegadas, tener a las yeguas en pastoreo o en grandes paddocks y a los machos, bien por entrenamiento, bien por su uso como sementales, en boxes.

El número de yeguas en el grupo T-A (n=16) fue superior al número de machos del grupo T-B (n=7). Si bien se intentó que ambos grupos tuvieran un número similar, no fue posible, debido a las prácticas de manejo. Como se ha descrito antes, las yeguas permanecen en la ganadería para la cría y los machos se venden, a menos que se utilicen como sementales o para actividades deportivas.

Por otro lado, algunas investigaciones no han hallado correlaciones significativas entre seropositividad y edad de los animales (Grandi et al., 2011; Farkas et al., 2013; García-Bocanegra et al., 2013), si bien otros estudios no coinciden con estos resultados, mostrando que la seropositividad aumenta con la edad (Kouam et al., 2010; García-Bocanegra et al., 2013; Karatepe et al., 2009; Steinman et al., 2012; Munkhjargal et al., 2013; Vieira et al., 2013; Rapoport et al., 2014), como consecuencia de la infección de por vida con *Theileria equi*. En conocimiento de los autores, no se ha evaluado aún el efecto de la edad en la sintomatología y en la gravedad de la misma en caballos con theileriosis.

Los síntomas más comunes en el grupo T-A fueron anorexia o cambios de apetito (93,75%), palidez de mucosas (81,25%), seguidos por depresión (50%) e ictericia (50%). En cuanto al grupo T-B, los síntomas más frecuentes fueron pérdida de rendimiento o incapacidad para entrenar correctamente (71,43%) y depresión (57,14%). Estos síntomas coinciden con los reseñados por Zobba et al. (2008) en caballos pertenecientes a zonas endémicas (Italia). Ninguno de los animales mostró síntomas más severos, como hemoglobinuria, que es más típico de animales que no han tenido contactos previos con el parásito o que experimentan fases de inmunosupresión (Wise et al., 2013; 2014). El síntoma predominante del grupo T-B fue la pérdida de rendimiento, que en gran medida podría deberse a la anemia.

La fiebre se considera un signo clínico común de piroplasmosis equina (Camacho et al., 2005; Zobba et al., 2008; Wise et al., 2013; 2014), aunque en nuestro estudio los

caballos no presentaron fiebre en el momento del examen. Este hallazgo podría deberse a que, la fiebre podría haber sido intermitente y por tanto, podría no haber coincidido con el momento del examen físico o bien, que no existió fiebre en estos animales por la levedad de la sintomatología. La frecuencia respiratoria (FR) de los caballos T-A y T-B fue superior al grupo control. Este resultado no se asoció a las condiciones ambientales, ya que todos los exámenes físicos se hicieron bajo condiciones ambientales similares. El análisis de correlación mostró que la FR fue dependiente de la TR ($r=0,521$) y del HTO ($r=-0,838$). Estos datos indicarían que los valores de FR superiores en los caballos con *Theileria equi* frente a los control, podría ser un mecanismo compensatorio de la reducción en el transporte de oxígeno derivado de la anemia.

Clásicamente, la piroplasmosis equina (babesiosis y theileriosis) se ha clasificado como hiperaguda, aguda o crónica, en función de la severidad de los síntomas. Algunos autores no diferencian entre babesiosis y theileriosis (De Waal, 1992; Camacho et al., 2005), a pesar de que se ha descrito que la theileriosis tiene una clínica más severa que la babesiosis (Wise et al., 2013; 2014). La forma crónica de la piroplasmosis se caracteriza por anorexia, letargia y pérdida de peso, síntomas que son similares a los hallazgos de la presente investigación, tanto en el grupo T-A como en el T-B. En general, la fase crónica de la enfermedad se asocia a infecciones subclínicas y un estado de portador crónico. Los portadores subclínicos podrían presentar síntomas a lo largo de todo el año, particularmente después de experimentar inmunosupresión y estrés. Los datos aportados en nuestro estudio, sin embargo, se recogieron en primavera y verano, después de la exposición al vector.

Como se acaba de indicar, la fase crónica de la enfermedad se asocia con infecciones subclínicas y un estado de portador. Los portadores subclínicos podrían exhibir signos clínicos durante todo el año, especialmente después de la supresión inmune causada por el estrés. De hecho, en los países mediterráneos, se cree que la sintomatología puede aparecer en cualquier estación (Friedhoff et al., 1990; Bashiruddin et al., 1999; Zobba et al., 2008). Sin embargo, todos los casos de la investigación actual se registraron en primavera y verano, después de la exposición a las garrapatas. Según este periodo de aparición, de forma teórica, se trataría de una fase aguda de la infección, a pesar de la

sintomatología leve que los animales presentaron. No obstante, también hay que mencionar que en el momento de la obtención de los datos, muchas yeguas estaban al final de la gestación o inicio de la lactación, circunstancias que podrían haber favorecido la inmunosupresión y la reaparición clínica del protozoo. Por tanto, no se puede descartar la reagudización de un proceso crónico.

Una posible explicación a la sintomatología tan leve mostrada por los caballos de la presente investigación es que, como la theileriosis es muy común en Andalucía, cualquier caballo que presenta anemia, depresión y/o fiebre, es tratado lo más rápidamente posible, en un intento de limitar la severidad del proceso y también para hacer descender la tasa de anticuerpos en sangre. Hay que tener en cuenta que es obligatoria una prueba serológica negativa para el movimiento internacional de caballos, y para la participación en eventos deportivos internacionales.

9.6.2. Eritrograma

El hallazgo hematológico más común fue la anemia, resultado que coincide con lo mostrado por otros autores (Camacho et al., 2005; Zobba et al., 2008; Wise et al., 2013; 2014; Mahmoud et al., 2016). De hecho, trece yeguas del grupo T-A (13/16) y tres machos del grupo T-B (3/7) habían presentado clínicamente mucosas pálidas. Laboratorialmente, se observó que las yeguas del grupo T-A tuvieron valores inferiores de GR, HB y HTO en comparación con los otros dos grupos. Por otro lado, los datos de HTO fueron diferentes significativamente entre los tres grupos (32,9% grupo T-A; 36,7% grupo T-B; 43,4% grupo C).

La patogenia de la anemia, si bien no tan estudiada en la theileriosis equina como en la babesiosis canina, en la theileriosis bovina o en el paludismo, otras patologías hemoprotozoarias, posiblemente sea multifactorial. Un mecanismo importante de la anemia es la hemólisis, causada por la liberación de los merozoitos durante el ciclo biológico del parásito, condicionando hemólisis intravascular. A este hecho, se le une la

hemólisis extravascular, ya que las células infectadas son eliminadas por las células del sistema fagocítico-mononuclear, fundamentalmente a nivel esplénico (Wise et al., 2013; 2014). En la presente investigación, parece que se produjo anemia hemolítica intravascular en el grupo T-A, como muestran los valores superiores de HCM y CHCM, si bien no se puede descartar una hemólisis in vitro, como se ha descrito en perros con babesiosis (Zygner et al., 2007). De hecho, en nuestra investigación, se detectó una correlación positiva entre CHCM y BIL ($r=0,537$), probablemente como reflejo de la hemólisis.

Recientemente, se ha detectado que el estrés oxidativo y las lesiones en el ADN podrían estar implicados como mecanismos fisiopatológicos de la anemia de caballos con theileriosis (Radakovic et al., 2016). Ya previamente se había descrito que la producción incrementada de radicales libres determina hemólisis en vacuno con theileriosis (*Theileria annulata*) (Graham et al., 2001; Nazifi et al., 2009; Saleh et al., 2011; El Deeb y Iabob, 2012). En nuestra investigación, no se han hecho estudios sobre las alteraciones en el equilibrio oxidante- antioxidante en estos caballos, pero sería muy interesante en el futuro. Si estos animales padeciesen anemia parcialmente asociada al estrés oxidativo, sobre todo en casos más severos, sería recomendable evaluar la posibilidad de introducir la administración de compuestos antioxidantes como complemento del tratamiento.

La hipofosfatemia es otra posible causa a considerar en la patogenia de la anemia en la theileriosis bovina (Sandhu et al., 1998; El-Deeb y Iabob, 2012; Abd Allah, 2015), asociando la reducción de P en estos animales a defectos tubulares renales. En perros con babesiosis, por el contrario, se ha descrito una hiperfosfatemia (Camacho, 2006), que el autor asoció a la presencia de enfermedad glomerular. En el caballo, los resultados son dispares. De Waal et al. (1987) en una infección experimental de piroplasmosis, describió hipofosfatemia. Zobba et al. (2008) encontraron 9 caballos con niveles reducidos de P (6 positivos a *Theileria equi*, 1 positivo a *Babesia caballi* y 2 positivos a ambos parásitos) y 3 con valores elevados de P (1 positivo a *Babesia caballi* y 2 positivos a ambos hemoprotozoos). En nuestro estudio, hemos encontrado que las yeguas del grupo T-A tuvieron valores superiores de P (3,2 mg/dl) en comparación con el grupo control, sólo con el grupo C (2,25 mg/dl). No hubo diferencias entre T-A y T-B. Quizá las concentraciones

superiores de P en el grupo T-A derivan de la hemólisis intravascular, con la liberación de P desde el interior del hematíe hacia la circulación sanguínea (Lippi et al., 2006; Rendle et al., 2009). De hecho, se han encontrado correlaciones significativas entre HTO y BIL (-0,756) y P (-0,535).

Otro hallazgo hematológico a destacar fue el valor superior de VCM en las yeguas del grupo T-A (51,6 fl) en comparación con los otros dos grupos (47,6 y 47,0 fl para T-B y C, respectivamente), que puede indicar una anemia regenerativa en el grupo T-A. En esta especie, los GR se liberan desde la médula ósea como células maduras, de modo que el recuento de reticulocitos no es un procedimiento útil para evaluar la respuesta regenerativa a la hemorragia o a la hemólisis. Una indicación de hematopoyesis acelerada es un aumento de la anisocitosis, con valores superiores de VCM (Lording, 2008).

9.6.3. Leucograma

Las alteraciones del leucograma en caballos con theileriosis parecen estar supeditadas al estado de infección, duración del proceso y su severidad (Rudolph et al., 1975; Zobba et al., 2008; Wise et al., 2013; 2014). En vacuno con theileriosis tropical (*Theileria annulata*), la leucopenia, junto con neutropenia, eosinopenia y linfocitosis son las modificaciones más comunes en el leucograma (Omer et al., 2002; Osman y Al-Gaabary, 2007; Mahmmud et al., 2011). Otros autores, por el contrario, describen linfopenia, como resultado de la destrucción de LINFs en los órganos linfoides (El-Deeb y Iabob, 2012). En perros con babesiosis natural, la neutrofilia se ha descrito en un 21% de los animales, y la neutropenia en un 5% (Guelfi y Candebat, 1998). Otros autores han encontrado una neutropenia intermitente en un periodo entre 4 y 28 días post-infección en el perro (Vercammen et al., 1997). En estudios experimentales de *Babesia canis*, Schetters et al. (2009) observaron leucopenia tras la infección, dependiendo el inicio de este cambio de la dosis infectiva administrada. Furlanello et al. (2005), también en perros, pero en este caso, en infecciones naturales, hallaron que un 69,5% de los animales tenía leucopenia, un 73,9% neutropenia, un 65,2% linfopenia y un 26,1% monocitopenia.

En nuestro caso, no se observaron diferencias significativas en el leucograma en los tres grupos de caballos. Sí que encontramos que, los caballos del grupo T-B tenían valores de LINF superiores a los otros grupos (T-A y control), pero dentro de los límites de referencia para la especie equina. Este número mayor de LINF del grupo T-B podría venir dado por la liberación de adrenalina y por la esplenocntracción. Los caballos del grupo T-B eran sementales, sometidos a entrenamiento diario y generalmente con un temperamento más nervioso que las yeguas de cría, y quizá esta característica haya condicionado parcialmente los resultados.

Por otro lado, se ha visto que, las yeguas del grupo T-A con valores superiores de varias APPs, tenían más NEU que las yeguas con concentraciones de APPs dentro de los límites normales (6,500 vs. 4,350 $10^3/\mu\text{l}$), lo cual indicaría que, en la fase aguda del proceso, el grado de inflamación está relacionado con el número de NEUs.

9.6.4. Bioquímica sérica

Las concentraciones de BIL en suero, en la presente investigación, fueron significativamente superiores en las yeguas del grupo T-A (3,0 mg/dl) que en los otros dos grupos (1,4 mg/kg, grupo T-B; 1,1 mg/kg, grupo C), sin diferencias entre estos dos últimos. Los niveles superiores de BIL son compatibles con la ictericia que se observó clínicamente en 50% de los animales del grupo T-A. Este hallazgo clínico es muy común en caballos con theileriosis (Zobba et al., 2008; Rothschild, 2013; Wise et al., 2013; 2014), habiéndose descrito también en vacas con theileriosis (Omer et al., 2002; Parashar et al., 2016) y en perros con babesiosis (Lobetti et al., 2000; Furlanello et al., 2005; Schoeman, 2009; Sudhakara Reddy et al., 2016). La causa más probable es la anemia hemolítica, si bien también puede deberse a la lesión hepática que se produce en animales con piroplasmosis. En la presente investigación, todos los análisis bioquímicos hepáticos estuvieron dentro de los rangos de referencia, de modo que la hiperbilirrubinemia podría ser un reflejo de la anemia hemolítica. Una segunda justificación de la hiperbilirrubinemia puede ser la anorexia, que fue un síntoma destacado en el grupo T-A (93,75%).

Las concentraciones de CREAT y la actividad LDH superiores en el grupo T-B (2,0 mg/dl y 1072 UI/l, respectivamente), frente a los grupos T-A (1,35 mg/dl y 1001 UI/l) y C (1,2 mg/dl y 798,5 UI/l) podrían venir dadas por el hecho de que eran machos y en entrenamiento activo en el momento de la infección. En investigaciones previas, se ha descrito que los caballos machos tienen valores superiores de LDH que las hembras, posiblemente debido a la mayor masa muscular de los primeros (Muñoz et al., 2012). Por tanto, en principio, no se cree que la mayor actividad LDH del grupo T-B pueda deberse a una lesión hepatocelular causada por *Theileria equi*, ya que las actividades de las demás enzimas hepáticas (ALP, GGT, AST) fueron similares en los tres grupos, por lo que se sugiere que el origen de la diferencia entre LDH estuvo asociada más con el músculo que con el hígado. No obstante, no se puede descartar completamente que, estos caballos, al estar en entrenamiento y requerir un mayor aporte de oxígeno hacia el músculo durante el ejercicio, hayan experimentado elevaciones subclínicas de las enzimas musculares. La CK, sin embargo, no mostró valores diferentes entre los tres grupos. Hay que reseñar que, estas enzimas tienen una cinética sanguínea diferente tras una lesión muscular. La enzima CK tiene el pico máximo de liberación hacia sangre unas 4-6 h después del inicio de una lesión muscular, y su vida media en circulación es aproximadamente de unas 6-10 h. Por tanto, si la lesión muscular no continúa, la enzima CK desciende en sangre a partir de este momento. Por el contrario, la enzima AST presenta una cinética muy diferente, con una liberación máxima desde músculo a las 72 h tras empezar la lesión y una vida media mucho más prolongada, de forma que puede permanecer elevada hasta varias semanas después de desaparecer la lesión muscular (Lindsay et al., 1989; Valentine, 2003). Por ello, los valores superiores de la enzima LDH, sin elevación concomitante de CK, descartan una lesión muscular.

9.6.5. Perfil de coagulación

Los dos hallazgos en la presente investigación en relación al perfil de coagulación son: la trombocitopenia del grupo T-B y el mayor TPT del grupo T-A. Numerosos autores han descrito grados variables de trombocitopenia en caballos infectados por estos protozoos (Allen et al., 1975; De Waal et al., 1987; De Waal, 1992; Camacho et al., 2005; Diana et al., 2007; Zobba et al., 2008; Wise et al., 2013; 2014). Así se ha identificado una reducción del 39% en el recuento de PLT en caballos infectados por *Theileria equi*, un 80% en el caso de *Babesia caballi* y un 100% en caballos con infecciones duales (De Waal et al., 1987; Diana et al., 2007; Wise et al., 2013).

En general, se acepta que las trombocitopenias son comunes, tanto laboratorial como clínicamente en animales afectados por patologías protozoarias. Así, en perros con babesiosis, el hallazgo hematológico más común es la trombocitopenia, independientemente de la especie de *Babesia* (Pagés et al., 1990; Bourdeau y Guelfi, 1995; Lobetti et al., 2000; Kraje, 2001). De hecho, en un estudio sobre babesiosis canina realizado en España (Ruiz de Gopegui et al., 2007), se detectó trombocitopenia en 45 de los 45 perros estudiados, llevando a estos autores a afirmar que, en ausencia de trombocitopenia, el diagnóstico de babesiosis es improbable. Con respecto a su severidad, en las infecciones experimentales, la trombocitopenia es común, pero nunca severa (Vercammen et al., 1997). Por el contrario, en infecciones naturales, la trombocitopenia oscila entre leve a severa (Furlanello et al., 2005; Schetters et al., 2009). Igualmente, la trombocitopenia es común en vacuno infectado por *Theileria annulata* (Singh et al., 2001; Omer et al., 2002; El-Deeb y Iabob, 2012).

En todas estas especies, incluyendo caballos, se han propuesto tres teorías patogénicas para justificar la trombocitopenia: destrucción inmunomediada, secuestro esplénico y consumo en caso de CID de baja intensidad. Está claro que, la piroplasmosis severa resulta en hipercoagulabilidad, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o SIRS y como consecuencia, disfunción multiorgánica. Sin embargo, este resultado tan severo no aparece comúnmente en los animales de zonas endémicas, y a pesar de ello existe trombocitopenia. Por lo tanto, las dos primeras hipótesis parecen más probables. De hecho,

Furlanello et al. (2005) midieron las concentraciones de los productos derivados del fibrinógeno (PDFs) y de D-dímeros, como indicadores de CID en perros con babesiosis y solo 4 de 23 mostraron niveles incrementados de estos compuestos. Este resultado llevó a Furlanello et al. (2005) a sugerir que, la CID no parece ser una causa importante de trombocitopenia en casos de babesiosis europea canina, y posiblemente lo mismo ocurra en el caballo. En conocimiento de los autores, aún no se ha cuantificado la concentración de estos compuestos en el caballo con theileriosis. Los D-dímeros son buenos marcadores de CID en perros (Caldin et al., 2000; Prins et al., 2010; Thawley et al., 2016), personas (Soomro et al., 2016) y caballos (Goehring et al., 2013; Cesarini et al., 2016).

Si bien la trombocitopenia se ha asociado a la aparición clínica de petequias en el caballo con theileriosis (De Waal, 1992; Wise et al., 2013), ninguna de las yeguas del estudio (grupo T-A) presentó este síntoma. Por otro lado, las yeguas con mayor inflamación y valores de APPs más alterados, no tuvieron un número inferior de PLT, por lo que, según estos datos, y dentro de los límites que nosotros hemos detectado, el descenso de PLT no está asociado a la intensidad del proceso inflamatorio causado por *Theileria equi*.

Por otro lado, se ha indicado que estos parásitos, alteran la coagulación sanguínea del caballo afectado, a través de mecanismos no muy bien conocidos, dando lugar a una elongación de los tiempos de coagulación (Allen et al., 1975; Wise et al., 2013). La incidencia de estas alteraciones en el caballo no se conoce y en conocimiento de los autores, excepto en algunos artículos experimentales no muy recientes (Allen et al., 1975), los cambios en el perfil de coagulación no se han analizado en caballos con theileriosis. En nuestro estudio, hemos detectado que, las yeguas del grupo T-A tuvieron un TPT más prolongado que el grupo control (11,2 vs 9,40 s, valores de referencia en nuestro laboratorio: 9,00-11,00 s). Considerando estos valores de referencia, 7/16 yeguas del grupo T-A mostraron TPT superiores a 11,0 s, con un valor individual máximo de 15,5 s. Solo 2 caballos del grupo T-B (2/7) tuvieron duraciones de TPT superiores a 11 s. En el grupo control, ninguno de los animales superó los 11 s. La yegua con el valor máximo de TPT, sin embargo, no presentó alteraciones hematológicas ni bioquímicas más marcadas, ni tampoco variaciones más intensas en las concentraciones de APPs. Por tanto, nuestros

resultados muestran que, en caballos con theileriosis, se pueden hallar alteraciones en la vía extrínseca y común de la coagulación, sin que existan alteraciones concomitantes en la hemostasia primaria (sin trombocitopenia simultánea). Por el contrario, la vía intrínseca no se afectó en ninguno de los animales (ni en el grupo T-A ni en el T-B, estando en el 100% de los animales dentro de los límites de referencia para la aPTT en nuestro laboratorio, inferior a 55 s.).

Las alteraciones en la coagulación secundaria han sido también escritas en perros con babesiosis (Furlanello et al., 2005; Ruiz de Gopegui et al., 2007; Rafaj et al., 2009), así como en vacas con infección experimental por *Theileria annulata* (Singh et al., 2001).

9.6.6. Proteínas de fase aguda

La interpretación de la APR en caballos PRE con theileriosis, en la presente investigación, fue compleja, debido a que muchos caballos enfermos, con sintomatología, mostraron concentraciones de APPs dentro del rango de referencia. En general, la APR inducida por la theileriosis en estos caballos fue limitada, posiblemente debido a que todos los animales incluidos en esta investigación pertenecían a una zona endémica, por lo que es de suponer que habrían desarrollado inmunidad contra el parásito. Esta circunstancia habría actuado como limitante de la severidad de la respuesta inflamatoria asociada a la infección o, de forma alternativa o concomitante, como se ha comentado en anterioridad, la elevada prevalencia de esta infección, hace que el diagnóstico y el tratamiento sean precoces, antes de que los animales lleguen a manifestar síntomas severos.

La proteína SAA es una de las APPs más usadas en la clínica equina, debido a su rápida respuesta a la inflamación (Andersen et al., 2012; Belgrave et al., 2013; Hooijberg et al., 2014; Dondi et al., 2015; Leclere et al., 2015; Daniel et al., 2016), de modo que en la actualidad, se ha incorporado a los perfiles bioquímicos sanguíneos en hospitales equinos especializados. En nuestro caso, solo 4 yeguas del grupo T-A tuvieron valores elevados, y ningún animal en los otros 2 grupos (T-B y control). Estas yeguas del grupo T-A,

experimentaron incrementos de SAA relevantes (valor de referencia <0,48 mg/l, yeguas con valores de hasta 300 mg/l), reflejando una inflamación moderada. El porqué estas yeguas presentaron esta manifestación laboratorial de inflamación, más intensa que en el resto de los animales, no se sabe. Su edad osciló entre 2-12 años, si bien el valor máximo de SAA correspondió a un animal de 12 años. Una posible justificación es la diferencia en el inicio del tiempo de infección, al tratarse de un proceso natural y/o bien que los animales hayan recibido dosis infectivas diferentes. En infecciones experimentales por *Babesia canis* en perro, la intensidad y la cinética de las APPs estuvieron supeditadas a la dosis infectiva (Schetters et al., 2009).

Por otro lado, los valores de SAA no estuvieron correlacionados con la exploración física ni con los parámetros del leucograma. Sí se apreció una correlación negativa entre SAA y HTO, reflejando que la severidad de la anemia está correlacionada con la inflamación, de modo que mientras mayor es el grado de inflamación aguda, más intensa es la anemia.

La CRP, considerada una APP muy útil en el perro (Cerón et al., 2005; Nakamura et al., 2008; Cray et al., 2010; Eckersall y Bell, 2010), en el caballo, es una APP moderada, experimentando incrementos inferiores al SAA en respuesta a un estímulo inflamatorio. En nuestra investigación, hemos hallado que las yeguas del grupo T-A tuvieron concentraciones significativas superiores a los otros dos grupos (36,30 µg/dl vs. 28,50 y 27,15 µg/dl para los grupos T-B y control respectivamente). No disponemos de datos de referencia para esta APP en el caballo, ya que otros autores han utilizado una técnica analítica diferente. No obstante, si consideramos como límite superior del rango de referencia el valor máximo encontrado de forma individual en el grupo control (50 µg/dl), 4 animales del grupo T-A mostraron valores notablemente superiores a este punto de corte, sugiriendo una inflamación de mayor intensidad.

Un resultado inesperado es que, no se han encontrado diferencias significativas entre grupos en las concentraciones de SAA, pero sí de CRP. Esto podría tener dos posibles justificaciones. En primer lugar, las muestras de sangre podrían haberse tomado varios días después del inicio de la infección, cuando la sintomatología se hizo más evidente. Las dos

APPs muestran una cinética diferente. Mientras que las concentraciones de SAA aumentan pocas h después del inicio de la lesión, con un valor máximo a los 1-2 días (Pepys et al., 1989; Nunokawa et al., 1993; Hultén et al., 2002), la CRP comienza su elevación a los 3-5 días de la agresión (Takiguchi et al., 1990). Esta diferente cinética podría justificar los resultados encontrados. Una segunda justificación es que la APR podría variar en función de la naturaleza del proceso inflamatorio.

Cabe reseñar que, se han encontrado correlaciones significativas entre las concentraciones de CRP, GR (-0,419), LINF (-0,454) y aPTT (0,430). Estos datos podrían interpretarse como que, los caballos con valores superiores de CRP se caracterizarían por anemia y linfopenias más intensas y duraciones superiores del tiempo de coagulación aPTT.

La interpretación de las concentraciones de Hp en procesos inflamatorios que cursan con hemólisis es compleja, debido a la interacción de dos mecanismos: 1) la inflamación, que induce aumentos moderados de esta APP; 2) la hemólisis. Esta APP presenta un papel importante en la eliminación del Fe libre y de la HB de la circulación, por lo que se pueden hallar descensos en procesos hemolíticos. De este modo, se han descrito reducciones de la concentración de Hp en perros con *Dirofilaria immitis* (Méndez et al., 2014) y en babesiosis canina (Matijatko et al., 2007), detectándose incrementos de Hp 3 días después del tratamiento en perros (Matijatko et al., 2007). Por este motivo, se ha sugerido que la Hp no es un indicador útil de inflamación en aquellos procesos que cursan con hemólisis (Weidmeyer y Solter, 1996; Matijatko et al., 2007; Méndez et al., 2014). En la presente investigación, de hecho, se ha hallado una correlación negativa entre HCM y Hp (-0,452), reflejando posiblemente el descenso de esta APP en presencia de hemólisis.

En nuestro caso, no hemos observado diferencias estadísticas en Hp entre los tres grupos, si bien se apreció una tendencia hacia valores más elevados en los grupos T-A (2,041 mg/l) y T-B (2,128 mg/l) frente al grupo control (1,340 mg/l). Además, tomando un valor de referencia de 3,0 mg/l en caballos sanos, según los datos de nuestro laboratorio, en el grupo T-A hubo 4 yeguas con valores superiores y en el grupo T-B, 1 caballo. Ninguno de los animales controles superó este valor.

La yegua que mostró los niveles más elevados de Hp, presentó además, leucocitosis ($13,34 \cdot 10^3/\mu\text{l}$), neutrofilia ($9,5 \cdot 10^3/\mu\text{l}$), anemia (HTO 31%), hiperbilirrubinemia (3,4 mg/dl), los niveles máximos de SAA (308 mg/l) y los mínimos de Fe (44 $\mu\text{l}/\text{dl}$). Por tanto, parece ser que de forma individual, esta APPs sí es útil, si bien la inflamación podría ser más severa de lo que verdaderamente se evidencia en sus valores si coexiste con hemólisis, como ocurre en las babesiosis.

Sin duda, el FIB ha sido la APP más utilizada tradicionalmente en la clínica equina (Hultén et al., 2002; Pollock et al., 2005; Borges et al., 2007; Jacobsen et al., 2009; Andersen et al., 2012; Copas et al., 2013; Corradini et al., 2014; Hooijberg et al., 2014; Daniel et al., 2016), posiblemente debido a la facilidad en su determinación y a su bajo coste económico. De este modo, se ha confirmado su elevación en numerosas patologías inflamatorias equinas. Su uso extendido contrasta con su cinética, ya que es una APP tardía, que requiere unos 3-5 días para lograr los valores máximos tras el inicio del proceso inflamatorio (Andersen et al., 2012).

No hemos encontrado diferencias en la concentración de FIB en la presente investigación al comparar los tres grupos de caballos. Existen varios motivos para justificar estos resultados: 1) Puede ser que el tiempo transcurrido desde el inicio de la infección hasta el momento de la extracción de sangre hubiera variado entre animales, por lo que los resultados se habrían visto determinados por la cinética de esta APP; 2) Hemos utilizado el método de precipitación por calor para medir el FIB. Esta técnica, muy fácil de realizar y con un coste económico mínimo, es muy utilizada en clínica equina, pero es insensible a pequeñas variaciones (Campbell et al., 1981; Allen y Kold, 1988; Tamzali et al., 2001).

A pesar de estas limitaciones, inherentes a un trabajo de campo, con una infección natural, no experimental, hemos hallado que 3 animales del grupo T-A y 1 animal del grupo T-B mostraron valores superiores a los máximos de referencia para nuestro laboratorio (400 mg/dl), mientras que ningún caballo del grupo control presentó este valor. Estos resultados reflejan que, en caballos con theileriosis leve, podemos hallar pequeñas elevaciones de las concentraciones de FIB.

Últimamente, se han publicado varias investigaciones en las que se le otorga a las concentraciones séricas/plasmáticas de Fe una gran relevancia como marcador de inflamación (Borges et al., 2007; Jacobsen et al., 2009; Andersen et al., 2012; Brosnahan et al., 2012; Corradini et al., 2014; Hooijberg et al., 2014). La concentración sérica/plasmática de Fe desciende rápidamente en respuesta a la inflamación, tanto en animales como en personas (Kemna et al., 2005; Ganz y Nemeth, 2009; Chikazawa y Dunming, 2016; Fraenkel, 2017). Se trata de un importante mecanismo de defensa por parte del hospedador, debido a que este elemento es esencial para la virulencia y replicación bacterianas. De hecho, se ha descrito una concentración anormalmente baja en una gran variedad de procesos patológicos, asociados con invasión microbiana, lesión tisular y proceso inflamatorio (Borges et al., 2007). El descenso es tan rápido, que se produce durante las primeras 24 h del comienzo de la inflamación (Andersen et al., 2012), siendo incluso este cambio más precoz que el experimentado por las APPs (Hultén et al., 2002; Jacobsen et al., 2005; Borges et al., 2007; Andersen et al., 2012).

Si bien en la presente investigación no se han observado diferencias significativas en las concentraciones séricas de Fe entre caballos control y con *Theileria*, posiblemente debido a la gran variabilidad individual de los caballos infectados, los valores mínimos de Fe (44 y 129,0 µg/dl) correspondieron a animales de los grupos T-A y T-B de forma respectiva. Además, cuando se seleccionó a tres animales del grupo T-A con las APPs más elevadas (SSA, Hp y FIB), se vio que estos individuos tenían niveles de Fe en suero inferiores (113,0 µg/dl) al resto de los integrantes del grupo T-A (160 µg/dl). Podría sugerirse que, el animal con los valores más bajos, estaría en el inicio de la inflamación inducida por *Theileria*, ya que se ha visto que las concentraciones de Fe se elevan unas 24-48 h tras concluir la inflamación (Andersen et al., 2012).

Hay una serie de factores que se deben tener en cuenta cuando se usa la concentración de Fe como marcador de inflamación sistémica, tales como edad, administración o elevación endógena de corticoides, hemólisis (tanto in vitro como in vitro), enfermedad hepática y suplementación de Fe (Borges et al., 2007). Varios de estos factores podrían haber concurrido en algunas yeguas del grupo T-A, fundamentalmente

hemólisis y leve lesión hepática, según los marcadores de lesión y función hepática. De hecho, se ha descrito que, a menudo, los caballos con patología hepática y/o hemólisis tienen una concentración de Fe elevada, a pesar de la inflamación (Borges et al., 2007). Si esto fuera así también en nuestros caballos, la concentración de Fe podría enmascarar la magnitud del proceso inflamatorio.

En general, cabe destacar que, debido a que el déficit de Fe es extremadamente raro en el caballo, una analítica con niveles bajos de este mineral, debe llevar a pensar en inflamación. Además, de forma individual, el descenso de la concentración de Fe fue útil para detectar animales con theileriosis y con un mayor grado de alteraciones laboratoriales (correlación significativa negativa entre Fe y BIL, NEU, CREAT, CK, AST, LDH, PLT, TPT).

Se ha confirmado un aumento de FERR en perros con desórdenes hemolíticos, neoplasias y enfermedades hepáticas (Friedrichs et al., 2010; Chikazawa et al., 2013; Bottari et al., 2016; Martínez-Subiela et al., 2016). En personas, la FERR ha recibido una atención especial en los últimos años, al considerar que podría ser un marcador potencial de pronóstico en pacientes críticos (Bennett et al., 2011; Piagnerelli et al., 2013; Tacke et al., 2016; Tonial et al., 2017). En el caballo, no obstante, el papel de la FERR como APP es dudoso (Smith et al., 1986; Hyypä et al., 2002). Más recientemente, Dondi et al. (2015), en caballos hospitalizados por patologías digestivas, observaron que la FERR disminuía en 14, y aumentaba en 17 de los 54 pacientes estudiados. Estos últimos autores, sí encontraron que los caballos que no sobrevivieron tenían concentraciones superiores de FERR en comparación con los sobrevivientes. Por otro lado, describieron correlaciones de la FERR con el número de GB, correlación que los autores interpretaron como que la FERR podría ser una APP en caballos con inflamación (Dondi et al., 2015). En nuestro caso, en caballos PRE con theileriosis, por el contrario, la FERR no fue diferente entre caballos infectados y control, si bien se han encontrado correlaciones con otros parámetros, como GR (-0,501), LINF (-0,453), GLU (-0,427) y LDH (-0,460). Por tanto, nuestros resultados no nos permiten afirmar que la FERR actuó como APP en la APR de caballos con theileriosis.

Serían necesarias más investigaciones para elucidar el papel de la FERR cuando coexisten estados inflamatorios y hemolíticos en el caballo.

La capacidad de unión al Fe (bien total o TIBC; bien no saturada, UIBC), se han utilizado en el estudio del metabolismo férrico en perros (Marchetti et al., 2010; Caro et al., 2013; Silvestrini et al., 2014; Zaldívar-López et al., 2014; Bottari et al., 2016) y caballos (Brommer et al., 2001; Brosnahan et al., 2012; Assenza et al., 2016). Los estudios realizados en personas, han demostrado que los valores de TIBC o de UIBC se reducen en respuesta a un proceso inflamatorio (Hoeger et al., 2015; Lukaszyk et al., 2015). De igual modo, Furlanello et al. (2005), en perros con babesiosis, documentaron que, de los 23 perros estudiados, 11 tuvieron valores bajos de TIBC, y el resto de los animales mostró datos dentro el rango de referencia. Ningún perro mostró valores elevados para TIBC. Estos resultados coinciden con los presentados por otros autores, en perros con procesos inflamatorios de etiología variada (Baker et al., 1988; Lilliehöök et al., 1998; Silvestrini et al., 2014).

En nuestra investigación los valores de UIBC fueron superiores en el grupo T-A que en el grupo control. Además, se ha observado que, las yeguas del grupo T-A con valores de 3 APPs más elevadas (SAA, Hp y FIB) tuvieron concentraciones superiores de UIBC (350,7 vs. 244,2 µg/dl), al contrario de lo esperado en función de los artículos publicados para perros y personas, en los cuales, como se ha citado en el párrafo anterior, la inflamación conduce a un descenso de TIBC. Hay que tener en cuenta que en nuestra investigación, se ha medido la capacidad insaturada, no la total (UIBC vs TIBC). No obstante, ambos parámetros tienen una estrecha relación, ya que los valores de UIBC derivan de los datos de TIBC menos la concentración sérica de Fe (Assenza et al., 2016). Recientemente, se han evaluado las concentraciones de UIBC en perros y vacas con patologías parasitarias (de Cezaro et al., 2016; Schmidt et al., 2016). En estos animales, una concentración reducida de Fe junto con valores altos de UIBC se han interpretado como una situación de deficiencia de Fe funcional, que se intenta compensar con la movilización de las reservas férricas, dando lugar a un capacidad incrementada de transporte de Fe y por tanto, datos elevados de UIBC (Weiss, 2011). El déficit de Fe en perros con *Ancylostoma*

se atribuyó a la lesión causada por los parásitos en la mucosa intestinal, con una pérdida activa de sangre desde los capilares lacerados. En vacuno, no obstante, de Cezaro et al. (2016), no encontraron diferencias en los valores de UIBC entre animales no parasitados y aquellos que tenían alta y baja carga parasitaria, a nivel digestivo y pulmonar.

El hallazgo de que las tres yeguas del grupo T-A tuvieran valores de UIBC superiores al resto del colectivo T-A, junto con una tendencia no significativa a datos superiores en las yeguas del grupo T-A frente a grupo control (252,1 vs. 209,2 $\mu\text{g/dl}$) podrían sugerir una movilización de las reservas de Fe en estos animales, como mecanismo de defensa frente a una pérdida crónica de sangre. De hecho, hemos encontrado una correlación significativa negativa entre UIBC y Fe (-0,401). Se podría especular que estos animales habrían tenido un mayor expolio por parte de las garrapatas, vector de la theileriosis. Esta sugerencia, no obstante, no se ha podido comprobar en nuestra investigación, ya que no se ha llevado a cabo un recuento de la carga de garrapatas. Por otro lado, todos los animales estaban desparasitados del mismo modo frente a endoparásitos y ectoparásitos, si bien no se puede afirmar que la carga parasitaria fuera igual en todos los animales debido a factores individuales.

Es de destacar que, en general, la correlaciones de las APPs con los parámetros clínicos y laboratoriales no han sido elevadas. Esto, en nuestra opinión, puede deberse al hecho de encontrar animales en diferentes fases de la infección, posiblemente con inflamación de diferente duración, al tratarse de un proceso natural, no experimental.

Otro aspecto a considerar es que, en animales con sintomatología leve, puede existir inflamación, a pesar de estar afebriles en el momento del examen clínico. Sería interesante, en un futuro, evaluar la APR en animales con síntomas más marcados, para ver si las APPs podrían tener un mayor valor pronóstico. Igualmente, un estudio a realizar en el futuro sería el examen de la respuesta de las APPs a diversos tipos de tratamientos.

El marcador inflamatorio que tuvo un mayor número de correlaciones significativas con las APPs fue el Fe, con correlaciones negativas con SAA (-0,499), CRP (-0,411), FIB (-0,417) y UIBC (-0,401). La correlación entre FIB y Fe ha sido previamente descrita en

caballos con procesos inflamatorios (Jacobsen et al., 2005; Borges et al., 2007), siendo en estas publicaciones, una correlación de baja intensidad, igual que en nuestro caso. Posiblemente ello se deba a la diferente duración desde el inicio de la inflamación. Igualmente, nuestros datos coinciden con los de otros autores en cuanto a las correlaciones entre las diversas APPs (Chavatte et al., 1991; Hultén y Demmers, 2002), al encontrar que los coeficientes de correlación son bajos. Este hecho no resta importancia clínica al uso de APPs. Por el contrario, es recomendable el uso seriado de dichos marcadores, y un examen individualizado de cada caballo afectado.

Por otro lado, numerosos estudios han puesto en evidencia que la APR, no solo depende de la especie animal, sino de la naturaleza e intensidad del proceso inflamatorio. Hasta este momento, no se ha habido evaluado la APR causada por *Theileria equi* en caballos, siendo el aspecto más relevante de nuestra investigación. Además, algunos estudios que han inducido inflamación de forma experimental, generalmente a partir de una vacunación, tanto en personas (Verschuur et al., 2004) como en caballos (Andersen et al., 2012), han evidenciado que existe una notable diferencia interindividual en las concentraciones de APPs. De hecho, tales diferencias han permitido separar a los individuos en tres grupos según su respuesta a la inflamación: hiperresponsivos, hiporresponsivos y normorresponsivos y estas mismas diferencias podrían haber ocurrido en la presente investigación.

9.7. CONCLUSIONES

El capítulo I analiza la sintomatología y los parámetros laboratoriales (eritrograma, leucograma, bioquímica sérica, perfil de coagulación, concentración de APPs y otros marcadores de inflamación y metabolismo férrico) en caballos PRE infectados de forma natural por *Theileria equi*, divididos en dos grupos (yeguas en pastoreo; n=16; caballos en entrenamiento y sementales, en estabulación; n=7), frente a un grupo control (n=10). Las principales conclusiones son las siguientes:

Primera. La sintomatología mostrada por los animales ha sido de intensidad muy leve, compatible con un estado de portador crónico subclínico. Sin embargo, el momento de aparición de la sintomatología (primavera y verano), cuando está presente el vector, hace pensar en una reinfección, si bien de intensidad baja, posiblemente asociada al estado de premunidad del hospedador.

Segunda. Los síntomas y las alteraciones laboratoriales, dentro de su baja intensidad, fueron más evidentes en las yeguas en pastoreo en comparación con los machos estabulados, bien debido a un menor contacto de éstos últimos con el vector, bien a un control veterinario más exhaustivo al estar en entrenamiento.

Tercera. La anemia fue el signo clínico y laboratorial más constante, en parte derivado de hemólisis, como reflejan las concentraciones elevadas de bilirrubina en el grupo de las yeguas infectadas frente al control. La hiperbilirrubinemia no parece estar asociada a disfunción y/o lesión hepática, ya que los analitos hepáticos estuvieron dentro de los límites normales, si bien podría haberse debido en parte a la anorexia.

Cuarta. Las yeguas en pastoreo presentaron alteraciones laboratoriales en la hemostasis primaria y secundaria, afectando fundamentalmente a las vías intrínseca y común de la coagulación (trombocitopenia y un incremento de la duración del tiempo de protrombina), sin presentar sintomatología asociada.

Quinta. La respuesta inflamatoria a la infección, en general, fue de intensidad muy leve, observándose solamente diferencias entre grupos en las concentraciones de la proteína C reactiva, si bien hay que destacar la gran variación interindividual.

Sexta. Algunos animales, concretamente varias yeguas en pastoreo, mostraron indicios laboratoriales más evidentes de inflamación, con valores elevados del número de neutrófilos, y concentraciones superiores a las normales de amiloide sérico A, proteína reactiva C, haptoglobina y fibrinógeno e inferiores de hierro.

9.8. RESUMEN

Características clínicas y laboratoriales, incluyendo proteínas de fase aguda, en caballos de Pura Raza Española positivos a *Theileria equi*.

Introducción. La theileriosis equina es una enfermedad transmitida por garrapatas causada por el protozoo apicomplexa intraeritrocitario, *Theileria equi*. Es un parásito común en las zonas templadas y con una seroprevalencia elevada en el sur de España. Los hemoprotozoos de otras especies animales, como *Babesia canis* en perros y *Theileria annulata* en vacas, inducen una respuesta inflamatoria o de fase aguda. Este aspecto aún no se ha demostrado en el caballo.

Objetivos. 1) Caracterización clínica y laboratorial en caballos Pura Raza Española (PRE) positivos a *Theileria equi*, pertenecientes a una zona endémica; 2) Evaluar si la infección por *Theileria* produce una respuesta de fase aguda y si la intensidad de dicha respuesta está correlacionada con la sintomatología y con los parámetros laboratoriales.

Hipótesis de partida. 1) Que, debido a que los animales pertenecen a una zona endémica, la sintomatología y las alteraciones laboratoriales serán de baja intensidad; 2) Que los síntomas y las alteraciones laboratoriales serán más intensos en animales en pastoreo en comparación con animales en estabulación, por una mayor probabilidad de contacto con el vector; 3) Que la infección por *Theileria equi* dará lugar a una respuesta inflamatoria con alteraciones en las concentraciones de las proteínas de fase aguda.

Material y métodos. Se han incluido 33 caballos PRE, pertenecientes a una misma ganadería y divididos en tres grupos, caballos positivos a *Theileria equi* y con sintomatología asociada (n=23) y caballos control, C (n=10). Los caballos infectados, a su vez, se dividieron en dos grupos, grupo T-A (n=16), formado por yeguas en pastoreo y grupo T-B (n=7), integrado por machos estabulados. Para evitar la influencia del sexo, el grupo C también se diferenció entre yeguas y machos (n=5 hembras en pastoreo; n=5 machos en estabulación), pero como no se hallaron diferencias significativas entre sexos

en los parámetros estudiados, todos los animales del grupo C se procesaron conjuntamente. Se realizó un examen clínico completo y se tomó una muestra de sangre venosa, para análisis hematológicos, bioquímicos séricos, hemostasis secundaria (tiempo de protrombina y el tiempo de tromboplastina parcial activada), y proteínas de fase aguda: amiloide sérico A (SAA), proteína C reactiva (CRP), haptoglobina (Hp) y fibrinógeno (FIB). Finalmente, se introdujeron en el estudio diversos parámetros asociados al metabolismo férrico, como hierro (Fe), ferritina (FERR) y capacidad de unión del hierro no saturado (UIBC).

Resultados. Los síntomas más comunes fueron, en el grupo T-A, anorexia o cambios en el apetito (93,75%), anemia (81,25%), ictericia (50%) y depresión (50%) y, en el grupo T-B, reducción del rendimiento (71,43%) y depresión (50%). En comparación con el grupo C, el grupo T-A mostró valores superiores de frecuencia respiratoria (FR), volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media, bilirrubina total, fósforo, (TPT), CRP y UIBC, e inferiores del número de glóbulos rojos, concentración de hemoglobina, valor hematócrito y número de plaquetas (PLT). El grupo T-B, en comparación con el C, presentó valores superiores de FR, número de linfocitos, creatinina y lactato deshidrogenasa (LDH) e inferiores de HTO y PLT. Se ha encontrado una gran variabilidad individual en la respuesta de fase aguda, con 3 animales del grupo T-A con valores notablemente elevados de SAA, CRP y Hp, junto con unos niveles muy bajos de Fe.

Conclusiones. La infección natural por *Theileria equi* indujo sintomatología, cambios laboratoriales y una respuesta inflamatoria de intensidad leve a moderada en caballos PRE de una zona endémica, de mayor intensidad en animales en pastoreo. Se detectó una gran variabilidad interindividual en la respuesta de fase aguda a la infección causada por el parásito.

Palabras clave. Bioquímica sanguínea. Caballos. Hematología. Respuesta de fase aguda. *Theileria equi*.

9.9. SUMMARY

Clinico-pathological characterization including acute phase proteins in pastured and stabled Andalusian horses naturally infected by *Theileria equi*

Background. Equine theileriosis is a tick-borne disease of Equidae caused by the intraerythrocytic apicomplexa protozoa, *Theileria equi*. This parasite has a high prevalence in temperate areas, including the south of Spain. The hemoprotozoan of other animal species, such as *Babesia canis* in dogs and *Theileria annulata* in cows lead to an acute inflammatory response. This response has not been evaluated in horses with theileriosis yet.

Objectives. 1) To describe clinical and laboratorial signs in Andalusian horses naturally positive to *Theileria equi* from an endemic area; 2) To assess whether the infection by *Theileria equi* induces an acute phase response and whether the intensity of such response is correlated with the intensity of the clinical signs and the laboratorial parameters.

Hypotheses to check. 1) Because horses belong to an endemic area, clinical signs and laboratorial findings would be of low intensity; 2) Clinical signs and laboratorial alterations would be more evident in pastured animals compared to stabled ones, because of the higher probability of contact with the vector in pastured animals; 3) Infection by *Theileria equi* would promote an inflammatory response with alterations in acute phase proteins.

Material and methods. A total of 33 Andalusian horses of a same farm was studied, divided into two groups: positive a *Theileria equi*, with associated clinical signs (n=23) and a control group C (n=10). Infected animals were further divided into group T-A (n=16), formed by mares in pasture and group T-B (n=7) formed by stabled stallions. In order to avoid the influence of gender, group C was formed by 5 mares at pasture and 5 stallions stabled. Because no significant differences were found between mares and males in the group C, all the data were processed together. All the animals were subjected to a clinical examination and a venous blood sample was taken in order to assess hematology, serum

biochemistry, secondary hemostasis (activated partial thromboplastine and prothrombine times), acute phase proteins (serum amyloid A SAA; C reactive protein CRP; haptoglobin Hp; fibrinogen FIB) and parameters of iron metabolism, iron (Fe), ferritine (FERR), and unsaturated iron binding capacity (UIBC).

Results. The most common clinical signs in group T-A were anorexia or changes in appetite (93.75%), anemia (81.25%), icterus (50%) and depression (50%) and in the group T-B, a reduction in performance (81.25%) and depression (50%). Compared to the group C, group T-A showed higher values of respiratory rate (RR), mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, total bilirubin, phosphorus, CRP, TPT and UIBC, and lower values of the number of red blood cells, hematocrit and number of platelets (PLT). The group T-B compared to C, had higher values of RR, number of lymphocytes, creatinine and lactate dehydrogenase and lower of hematocrit and PLT. A huge interindividual variability was found, with three animals of the group T-A having notably high concentrations of SAA, CRP and Hp and low serum iron concentrations.

Conclusions. Natural infection by *Theileria equi* in horses from an endemic area was associated with mild to moderate clinical signs, laboratorial changes and an inflammatory response of low intensity, being more evident in pastured animals. However, a great interindividual variability was found in the acute response to the inflammation caused by the parasite.

Key words. Acute phase response. Blood biochemistry. Hematology. Horses. *Theileria equi*.

9.10. BIBLIOGRAFÍA

- ABD ELLAH MR. (2015). Studying the correlations among hematological and serum biochemical constituents in cattle theileriosis. *J Parasit Dis.* 39(2):134-139.
- ADASZEK Ł, GÓRNA M, WINIARCZYK S. (2012). Electrolyte level and blood pH in dogs infected by various 18S RNA strains of *Babesia canis* on the early stage of babesiosis. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 125(1-2):45-51.
- ALDRED AR, SCHREIDER G. (1993). The negative acute phase proteins. En: *Acute phase proteins: molecular biology, biochemistry and clinical applications.* CRC Press Inc, Boca Raton FL, pp. 21-37.
- ALLEN KV, KOLD SE. (1988). Fibrinogen response to surgical tissue trauma in horses. *Equine Vet J.* 20:441-443.
- ALLEN PC, FRERICHS WM, HOLBROOK AA. (1975). Experimental acute *Babesia caballi* infections. II. Response of platelets and fibrinogen. *Exp Parasitol.* 37(3):373-379.
- ALLSOPP MT, LEWIS BD, PENZHORN BL. (2007). Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. *Vet Parasitol.* 148:130-136.
- AMBAWAT HK, MALHOTRA DV, KUMAR S, DHAR S. (1999). Erythrocyte associated haemato-biochemical changes in *Babesia equi* infection experimentally produced in donkeys. *Vet Parasitol.* (85):319-324.
- ANDERSEN SA, PETERSEN HH, ERSBØLL AK, FALK-RØNNE J, JACOBSEN S. (2012). Vaccination elicits a prominent acute phase response in horses. *Vet J.* 191(2):199-202.
- ANDERSEN UV, REINEMEYER CR, TOFT N, OLSEN SN, JACOBSEN S, NIELSEN MK. (2014). Physiologic and systemic acute phase inflammatory responses in young horses repeatedly infected with cyathostomins and *Strongylus vulgaris*. *Vet Parasitol.* 201(1-2):67-74.
- ANDREWS AG, DYSKO RC, SPILMAN SC, KUNKEL RG, BRAMMER DW, JOHNSON KJ. (1994). Immune complex vasculitis with secondary ulcerative dermatitis in aged C57BL/6NNia mice. *Vet Pathol.* 31(3):293-300.
- ANDREWS NC. (1999). Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med.* 341(26):1986-1995.
- ARREDOUANI M, MATTHIJS P, VAN HOEYVELD E, KASRAN A, BAUMANN H, CEUPPENS JL, STEVENS E. (2003). Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. *Immunology.* 108(2):144-151.
- ARTHUR CK, ISBISTER JP. (1987). Iron deficiency. Misunderstood, misdiagnosed and mistreated. *Drugs.* 33:171-182.

- ASSENZA A, CASELLA S, GIANNETTO C, FAZIO F, TOSTO F, PICCIONE G. (2016). Iron profile in thoroughbred during a standard training program. *Aust Vet J.* 94(3):60-63.
- AUER DE, NG JC, THOMPSON HL, INGLIS S, SEAWRIGHT AA. (1989). Acute phase response in horses: changes in plasma cation concentrations after localised tissue injury. *Vet Rec.* 124(10):235-239.
- AZIZ DM, HISS-PESCH S, MIELENZ B, SAUERWEIN H. (2012). Haptoglobin baseline value in jennies and the effect of ovariectomy on its serum concentration. *Anim Reprod Sci.* 132(1-2):83-87.
- BACK H, PENELL J, PRINGLE J, ISAKSSON M, RONÉUS N, TREIBERG BERNDTSSON L, STÅHL K. (2015). A longitudinal study of poor performance and subclinical respiratory viral activity in Standardbred trotters. *Vet Rec Open.* 2(1).
- BADOLATO R, WANG JM, STORNELLO SL, PONZI AN, DUSE M, MUSSO T. (2000). Serum amyloid A is an activator of PMN antimicrobial functions: induction of degranulation, phagocytosis, and enhancement of anti-Candida activity. *J Leukoc Biol.* 67(3):381-386.
- BAKER DC, GAUNT SD, BABIN SS. (1988). Anemia of inflammation in dogs infected with *Ehrlichia platys*. *Am J Vet Res.* 49(7):1014-1016.
- BARRACHINA L, REMACHA AR, ROMERO A, VÁZQUEZ FJ, ALBAREDA J, PRADES M, RANERA B, ZARAGOZA P, MARTÍN-BURRIEL I, RODELLAR C. (2016). Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties. *Vet Immunol Immunopathol.* 171:57-65.
- BARRERA R, CARAPETO MV, HABELA MA, ZARAGOZA C. (2010). Patrón electroforético de proteínas séricas en caballos con babesiosis. *Arch Med Vet.* 42:173-178.
- BARTOLOMÉ DEL PINO LE, NARDINI R, VENEZIANO V. (2016). *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in central-Southern Italy: sero-molecular survey and associated risk factors. *J Parasitology.* 7(3):462-469.
- BASELER MW, BURRELL R. (1983). Purification of haptoglobin and its effects on lymphocyte and alveolar macrophage responses. *Inflammation.* 7(4):387-400.
- 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(1-2):75-83.
- BASSET J, AUGER L. (1931). Piroplasmose vraie du cheval (*P. caballi*) dans le sud-est. *Comp Rend Soc Biol.* 107:629.
- BAUSSERMAN LL, SARITELLI AL, VAN ZUIDEN P, GOLLAHER CJ, HERBERT PN. (1987). Degradation of serum amyloid A by

isolated perfused rat liver. *J Biol Chem.* 262(4):1583-1589.

BAYNES R, BEZWODA W, BOTHWHEEL T, KHAN Q, MANSOOR N. (1986). The non-immune inflammatory response: serial changes in plasma iron, iron-binding capacity, lactoferrin, ferritin and C-reactive protein. *Scand J Clin Lab Invest.* 46(7):695-704.

BELGRAVE RL, DICKEY MM, ARHEART KL, CRAY C. (2013). Assessment of serum amyloid A testing of horses and its clinical application in a specialized equine practice. *J Am Vet Med Assoc.* 243(1):113-119.

BENNETT TD, HAYWARD KN, FARRIS RW, RINGOLD S, WALLACE CA, BROGAN TV. (2011). Very high serum ferritin levels are associated with increased mortality and critical care in pediatric patients. *Pediatr Crit Care Med.* 12(6):e233-236.

BERG LC, THOMSEN PD, ANDERSEN PH, JENSEN HE, JACOBSEN S. (2011). Serum amyloid A is expressed in histologically normal tissues from horses and cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 144(1-2):155-159.

BOHN AA. (2013). Diagnosis of disorders of iron metabolism in dogs and cats. *Vet Clin North Am: Small Anim Pract.* 43(6):1319-1330.

BOHN AA. (2015). Diagnosis of disorders of iron metabolism in dogs and cat. *Clin Lab Med.* 25(3):579-590.

BORGES AS, DIVERS TJ, STOKOL T, MOHAMMED OH. (2007). Serum iron and plasma fibrinogen concentrations as indicators of systemic inflammatory diseases in horses. *J Vet Intern Med.* 21(3):489-494.

BOTTARI NB, CRIVELLENTI LZ, BORIN-CRIVELLENTI S, OLIVEIRA JR, COELHO SB, CONTIN CM, TATSCH E, MORESCO RN, SANTANA AE, TONIN AA, TINUCCI-COSTA M, DA SILVA AS. (2016). Iron metabolism and oxidative profile of dogs naturally infected by *Ehrlichia canis*: Acute and subclinical disease. *Microb Pathog.* 92:26-29

BOURDEAU P, GUELFY JP. (1995). La babésiose canine à *Babesia canis*. *Point Vét.* 27:11-24.

BOXER LA, SMOLEN JE. (1988). Neutrophil granule constituents and their release in health and disease. *Clin North Am.* 2:101-134.

BRITTENHAM GM, WEISS G, BRISSOT P, LAINÉ F, GUILLYGOMARC H A, GUYADER D, MOIRAND R, DEUGNIER Y. (2000). Disorders of iron metabolism: iron deficiency and overload. *Hematology.* New York: Churchill Livingstone, pp. 397-428.

BROMMER H, SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN MM. (2001). Iron deficiency in stabled Dutch warmblood foals. *J Vet Intern Med.* 15(5):482-485.

BROOKS MB. (2008). Equine coagulopathies. *Vet Clin North Am: Equine Pract.* 24(2):335-355.

- BROSNAHAN MM, ERB HN, PERKINS GA, DIVERS TJ, BORGES AS, OSTERRIEDER N. (2012). Serum iron parameters and acute experimental EHV-1 infection in horses. *J Vet Intern Med.* 26(5):1232-1235.
- BRÜNING A. (1996) Equine piroplasmiasis: an update on diagnosis, treatment and prevention. *Br Vet J.* 152:139-151.
- BULLONE M, DE LAGARDE M, VARGAS A, LAVOIE JP. (2015). Serum surfactant protein D and haptoglobin as potential biomarkers for inflammatory airway disease in horses. *J Vet Intern Med.* 29(6):1707-1711.
- BURSTEIN SA. (1997). Cytokines, platelet production and hemostasis. *Platelets.* 8:93-104.
- BUTLER CM, SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN MM, STOUT TA, VAN DER KOLK JH, WOLLENBERG LV, NIELEN 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. *Vet J.* 193(2):381-385.
- CALDIN M, FURLANELLO T, LUBAS G. (2000). Validation of an immunoturbidimetric D-dimer assay in canine citrated plasma. *Vet Clin Pathol.* 29(2):51-54.
- CAMACHO AT, GUITIAN FJ, PALLAS E, GESTALL JJ, OLMEDA A, HABELA MA, TELFORD SR, SPIELMAN A. (2005). *Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain. *Trop Anim Health Prod.* 37(4):293-302.
- CAMACHO AT. (2006). Piroplasma infection in dogs in northern Spain. *Vet Parasitol.* 138(1-2):97-102.
- CAMPBELL MD, BELLAMY JE, SEARCY GP. (1981). Determination of plasma fibrinogen concentration in the horse. *Am J Vet Res.* 42(1):100-104.
- CANISSO IF, BALL BA, CRAY C, WILLIAMS NM, SCOGGIN KE, DAVOLLI GM, SQUIRES EL, TROEDSSON MH. (2014). Serum amyloid A and haptoglobin concentrations are increased in plasma of mares with ascending placentitis in the absence of changes in peripheral leukocyte counts or fibrinogen concentration. *Am J Reprod Immunol.* 72(4):376-385.
- CARO JT, MARÍN LM, IAZBIK MC, ZALDIVAR-LÓPEZ S, BORGHESE H, COUTO CG. (2013). Markers of iron metabolism in retired racing Greyhounds with and without osteosarcoma. *Vet Clin Pathol.* 42(3):360-363.
- CARRICK JB, BEGG AP. (2008). Peripheral blood leukocytes. *Vet Clin North Am: Equine Pract.* 24(2):239-259.
- CASTEEL SW, TURK JR. (2002) Collapse/sudden death. En: *Large animal internal medicine.* Smith BP, Ed. St. Louis, MO: Mosby.

- CECILIANI F, CERÓN JJ, ECKERSALL PD, SAWERUEIN H. (2012). Acute phase proteins in ruminants. *J Proteomics*. 75(14):4207-4231.
- CERÓN JJ, ECKERSALL PD, MARTÍNEZ-SUBIELA S. (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol*. 34:85-99.
- CESARINI C, COTOVIO M, RÍOS J, ARMENGOU L, JOSE-CUNILLERAS E. (2016). Association between necropsy evidence of disseminated intravascular coagulation and hemostatic variables before death in horses with colic. *J Vet Intern Med*. 30(1):269-275.
- CESARINI C, MONREAL L, ARMENGOU L, DELGADO MÁ, RÍOS J, JOSE-CUNILLERAS E. (2014). Progression of plasma D-dimer concentration and coagulopathies during hospitalization in horses with colic. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 24(6):672-680.
- CHAUDHURI S, VARSHNEY JP, PATRA RC. (2008). Erythrocytic antioxidant defense, lipid peroxides level and blood iron, zinc and copper concentrations in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. *Res Vet Sci*. 85(1):120-124.
- CHAVATTE P, BROWN G, OUSEY JC, SILVER M, COTTRILL C, FOWDEN AL, MCGLADDERY AJ, ROSSDALE PD. (1991). Studies of bone marrow and leukocyte counts in peripheral blood in fetal and newborn foals. *J Reprod Fertil Suppl*. 44:603-608.
- CHEE Y, GREAVES M (2003). Role of coagulation testing in predicting bleeding risk. *Hematol J*. 4:373-378.
- CHENG T, MATHEWS K, ABRAMS-OGG A, WOOD D. (2011). The link between inflammation and coagulation: influence on the interpretation of diagnostic laboratory tests. *Compend Contin Educ Vet*. 33(2):E4.
- CHHABRA S, RANJAN R, UPPAL S, SINGLA LD. (2012). Transplacental transmission of *Babesia equi* (*Theileria equi*) from carrier mares to foals. *J Parasit Dis*. 36:31-33.
- CHIKAZAWA S, DUNNING MD. (2016). A review of anaemia of inflammatory disease in dogs and cats. *J Small Anim Pract*. 57(7):348-353
- CHIKAZAWA S, NAKAZAWA T, HORI Y, HOSHI F, KANAI K, ITO N, ORINO K, WATANABE K, HIGUCHI S. (2013). Change in serum ferritin concentration in experimentally induced anemia of chronic inflammation in dogs. *J Vet Med Sci*. 75(11):1419-1426.
- CIFTI G, URAL K, AYSUL N, CENESIZ S, GUZEL M, PEKMEZCI D, SOGUT MV. (2014). Investigation of the 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, total antioxidant and nitric levels of serum in dogs infected with *Babesia vogeli*. *Vet Parasitol*. 204(3-4):388-391.
- COPAS VE, DURHAM AE, STRATFORD CH, MCGORUM BC, WAGGETT B, PIRIE RS. (2013). In equine grass sickness, serum amyloid A and fibrinogen are elevated, and can aid

differential diagnosis from non-inflammatory causes of colic. *Vet Rec.* 172:395.

CORRADINI I, ARMENGOU L, VIU J, RODRÍGUEZ-POZO ML, CESARINI C, JOSE-CUNILLERAS E. (2014). Parallel testing of plasma iron and fibrinogen concentrations to detect systemic inflammation in hospitalized horses. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 24(4):414-20.

COUTINHO DA SILVA MA, CANISSO IF, MACPHERSON ML, JOHNSON AE, DIVERS TJ. (2013). Serum amyloid A concentration in healthy periparturient mares and mares with ascending placentitis. *Equine Vet J.* 45(5):619-624.

CRAY C (2012). Acute phase proteins in animals. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 105:113-150.

CRAY C, ZAIAS J, ALTMAN NH. (2010). Acute phase response in animals: a review. *Comp Med.* 59(6):517-526.

CRISMAN MW, SCARRATT WK, ZIMMERMAN KL. (2008). Blood proteins and inflammation in the horse. *Vet Clin North Am: Equine Pract.* 24(2):285-297.

CYWINSKA A, SZARSKA E, KOWALSKA A, OSTASZEWSKI P, SCHOLLENBERGER A. (2011). Gender differences in exercise-induced intravascular haemolysis during race training in thoroughbred horses. *Res Vet Sci.* 90(1):133-137.

DALLAP SCHAER BL, BENTZ AI, BOSTON RC, PALMER JE, WILKINS PA. (2009).

Comparison of viscoelastic coagulation analysis and standard coagulation profiles in critically ill neonatal foals to outcome. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 19(1):88-95.

DANIEL AJ, LEISE BS, BURGESS BA, MORLEY PS, CLONINGER M, HASSEL DM. (2016). Concentrations of serum amyloid A and plasma fibrinogen in horses undergoing emergency abdominal surgery. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 26(3):344-351.

DASTE T, LUCAS MN, AUMANN M. (2013). Cerebral babesiosis and acute respiratory distress syndrome in a dog. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 23(6):615-623.

DE CEZARO MC, TVARIJONAVICIUTE A, TECLES F, CÉRON JJ, ECKERSALL DP, FERREIRA JC, SCHMIDT EM. (2016). Changes in biochemical analytes in calves infected by nematode parasites in field conditions. *Vet Parasitol.* 219:1-6.

DE WAAL DT, VAN HEERDEN J, POTGIETER FT (1987). An investigation into the clinical pathological changes and serological response in horses experimentally infected with *Babesia equi* and *Babesia caballi*. *Onderstepoort J Vet Res.* 54:561-568.

DE WAAL DT, VAN HEERDEN JV (1994) *Equine piroplasmiasis*. En: *Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa*. Coetzer JA (ed), Oxford University Press, Cape Town.

- DE WAAL DT. (1990). The transovarial transmission of *Babesia caballi* by *Hyalomma truncatum*. Onderstepoort J Vet Res. 57(1):99-100.
- DE WAAL DT. (1992). Equine piroplasmiasis: a review. British Vet J. 148:6-14.
- DEGER S, DEGER Y, BICEK K, OZDAL N, GUR A. (2009). Status of lipid peroxidation, antioxidants, and oxidation products of nitric oxide in equine babesiosis: status of antioxidant and oxidant in equine babesiosis. J Equine Vet Sci. 29(10):743-747.
- DEL MAESTRO RF. (1984). Free radical injury during inflammation. Raven Press New York , pp. 87-102.
- DIANA A, GUGLIELMINI C, CANDINI D, PIETRA M, CIPONE M. (2007). Cardiac arrhythmias associated with piroplasmiasis in the horse: a case report. Vet. J. 174:193-195.
- DONDI F, LUKACS RM, GENTILINI F, RINNOVATI R, SPADARI A, ROMAGNOLI N. (2015). Serum amyloid A, haptoglobin, and ferritin in horses with colic: association with common clinicopathological variables and short-term outcome. Vet J. 205(1):50-55.
- DONNELLAN CM, MARAIS HJ. (2009). Equine piroplasmiasis. En: Infectious diseases of the horse. Mair TS, Hutchinson RE, eds. Cambridgeshire, England, UK: EVJ Ltd, pp. 333-340.
- DU CLOS TW, MOLD C. (2001). The role of C-reactive protein in the resolution of bacterial infection. Curr Opin Infect Dis. 14(3):289-293.
- DUGINA TN, KISELEVA EV, CHISTOV IV, UMAROVA BA, STRUKOVA SM. (2002). Receptors of the PAR family as a link between blood coagulation and inflammation. Biochemistry (Mosc). 67:65-74.
- ECKERSALL PD, BELL R. (2010). Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. Vet J. 185(1):23-27.
- EL-DEEB WH, IABOB OC. (2012). Serum acute phase proteins in control and *Theileria annulata* infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*). Vet Parasitol. 190(1-2):12-18.
- EL-GHMATI SM, ARREDOUANI M, VAN HOEYVELD EM, CEUPPENS JL, STEVENS EA. (2002). Haptoglobin interacts with the human mast cell line HMC-1 and inhibits its spontaneous proliferation. Scand J Immunol. 55(4):352-358.
- EL-GHMATI SM, VAN HOEYVELD EM, VAN STRIJP JG, CEUPPENS JL, STEVENS EA (1996). Identification of haptoglobin as an alternative ligand for CD11b/CD18. J Immunol. 156(7):2542-2552.
- EPSTEIN K. (2014). Coagulopathies in horses. Vet Clin North Am: Equine Pract. 30(2):437-452.
- EPSTEIN KL, BRAINARD BM, GIGUERE S, VRONO Z, MOORE JN. (2013). Serial viscoelastic and traditional coagulation testing in

- horses with gastrointestinal disease. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 23(5):504-516.
- ERBSLÖH JKE. (1975). Babesiosis in the newborn foal. *J. Reprod. Fert* . 23:725-726 .
- ESMON CT, FUKUDOME K, MATHER T, BODE W, REGAN LM, STEARNS-KUROSAWA DJ, KUROSAWA S. (1999). Inflammation, sepsis and coagulation. *Haematologica*. 84:254-259.
- FAGLIARI JJ, MCCLENAHAN D, EVANSON OA, WEISS DJ. (1998). Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally induced alimentary laminitis. *Am J Vet Res*. 59(10):1234-1237.
- FARKAS R, TÁNCZOS B, GYURKOVSKY M, FÖLDVÁRI G, SOLYMOSI N, EDELHOFER R, HORNOK S. (2013). Serological and molecular detection of *Theileria equi* infection in horses in Hungary. *Vet Parasitol*. 193(1-2):143-148.
- FOSTER AP, CUNNINGHAM FM. (2003). Substance P induces activation, adherence and migration of equine eosinophils. *J Vet Pharmacol Ther*. 26(2):131-138.
- FRAENKEL PG. (2017). Anemia of inflammation: A review. *Med Clin North Am*. 101(2):285-296.
- FRERICHS WM, HOLBROOK AA. (1974). Feeding mechanisms of *Babesia equi*. *J Protozool*. 21(5):707-709.
- FRIEDHOFF KT, TENTER AM, MULLER I. (1990). Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. *Rev Sci*. 9:1187-1194.
- FRIEDRICHS KR, THOMAS C, PLIER M, ANDREWS GA, CHAVEY PS, YOUNG KM. (2010). Evaluation of serum ferritin as a tumor marker for canine histiocytic sarcoma. *J Vet Intern Med*. 24(4):904-911.
- FRITZ D. (2010). A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008). *Parasitol Res*. 106(6):1339-1342.
- FURLANELLO T, FIORIO F, CALDIN M, LUBAS G, SOLANO-GALLEGO L. (2005). Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Vet Parasitol*. 134(1-2):77-85.
- GABAY C, KUSHNER I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 340(6):448-454.
- GANZ T, NEMETH E. (2009). Iron sequestration and anemia of inflammation. *Semin Hematol*. 46(4):387-393.
- GANZ T. (2003). Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*. 102(3):783-788.
- GARCÍA-BOCANEGRA I, ARENAS-MONTES A, HERNÁNDEZ E, ADASZEK L, CARBONERO A, ALMERÍA S, JAÉN-TELLEZ JÁ, GUTIERREZ-PALOMINO P, ARENAS A. (2013). Seroprevalence and risk factors associated

with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. *Vet. J.* 195:172-178.

GATT ME, URIELI-SHOVAL S, PRECIADO-PATT L, FRIDKIN M, CALCO S, AZAR Y, MATZNER Y. (1998). Effect of serum amyloid A on selected in vitro functions of isolated human neutrophils. *J Lab Clin Med.* 132(5):414-420.

GEORGES KC, EZEOKOLI CD, SPARAGANO O, PARGASS I, CAMPBELL M, D'ABADIE R, YABSLEY MJ. (2011). Case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. *Vet Parasitol.* 175:363-366.

GILLESPIE SH, DOW C, RAYNES JG, BEHRENS RH, CHIODINI PL, McADAM KP. (1991). Measurement of acute phase proteins for assessing severity of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Clin Pathol.* 44(3):228-231.

GIRACHEW A, SCHUSTER RK, JOSEPH S, WERNEY R, GEORGY NA, ELIZABETH SK, ASFAW YA, REGASSA F, WERNERY U. (2013). Piroplasmiasis in donkeys- a hematological and serological study in central Ethiopia. *J Equine Vet Sci.* 33:18-21.

GODDARD A, WIINBERG B, SCHOEMAN JP, KRISTENSEN AT, KJELGAARD-HANSEN M. (2013). Mortality in virulent canine babesiosis is associated with a consumptive coagulopathy. *Vet J.* 196(2):213-217.

GOEHRING LS, SOBOLL HUSSEY G, GOMEZ DIEZ M, BENEDICT K, MAXWELL LK, MORLEY PS, SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN MM,

LUNN DP. (2013). Plasma D-dimer concentrations during experimental EHV-1 infection of horses. *J Vet Intern Med.* 27(6):1535-1542.

GONNERMANWA, KANDEL R, CATHCART ES. (1996). Amyloid enhancing factor is produced by rats and amyloid-resistant CE/J mice. *Lab Invest.* 74(1):259-264.

GOPALAKRISHNAN, MAJI C, DAHIYA RK, SUTHAR A, KUMAR R, GUPTA AK, DIMRI U, KUMAR S. (2016). In vitro growth inhibitory efficacy of some target specific novel drug molecules against *Theileria equi*. *Vet Parasitol.* 217:1-6.

GRAHAM SP, BROWN DJ, VATANSEVER Z, WADDINGTON D, TAYLOR LH, NICHANI AK, CAMPBELL JD, ADAMSON RE, GLASS EJ, SPOONER RL. (2001). Proinflammatory cytokine expression by *Theileria annulata* infected cell lines correlates with the pathology they cause in vivo. *Vaccine.* 19(20-22):2932-2944.

GRANDI G, MOLINAR G, TITTARELLI M, SASSERA D, KRAMER LH. (2011). Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses from northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11(7):955-956.

GRANINGER W, THALHAMMER F, HOLLENSTEIN U, ZOTTER GM, KREMSNER PG. (1992). Serum protein concentrations in *Plasmodium falciparum* malaria. *Acta Trop.* 52(2-3):121-128.

- GREAVES M. (2004). Assessment of haemostasis. *Vox Sang.* 87(1):S47-S50
- GRUYS E, TOUSSAINT MJ, NIEWOLD TA, KOOPMANS SJ, VAN DIJK, E, MELOEN RM. (2006). Monitoring health by values of acute phase proteins. *Acta Histochem.* 108(3):229-232.
- GRUYS E, TOUSSAINT MJ; NIEWOLD TA, KOOPMANS SJ. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B.* 6(11):1045-1056.
- GUELFY JF, CANDEBAT D. (1998). Variations de l'hémogramme en fonction de l'ancienneté des symptômes chez les chiens adultes atteints de babésiose aigue spontanée. *Rev Med Vet.* 149:65-68.
- HABELA M, ROL JA, ANTÓN JM, PEÑA J, CORCHERO E, VAN HAM I, JONGEJAN E. (1999). Epidemiology of Mediterranean theileriosis in Extremadura region, Spain. *Parassitologia.* 41 Suppl 1:47-51.
- HAILAT NQ, LAFI SQ, AL-DARRAJI AM, AL-ANI FK. (1997). Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. *Vet Parasitol.* 69:1-8.
- HILL AG, SIEGEL J, ROUNDS J, WILMORE DW. (1997). Metabolic responses to interleukin-1: centrally and peripherally mediated. *Ann Surg.* 225(3):246-251.
- HOBO S, NIWA H, ANZAI T. (2007). Evaluation of serum amyloid A and surfactant protein D in sera for identification of the clinical condition of horses with bacterial pneumonia. *J Vet Med Sci.* 69(8):827-830.
- HOEGER J, SIMON TP, DOEMMING S, THIELE C, MARX G, SCHUERHOLZ T, HAASE H. (2015). Alterations in zinc binding capacity, free zinc levels and total serum zinc in a porcine model of sepsis. *Biometals.* 28(4):693-700.
- HOFER N, ZACHARIAS E, MULLER W, RESCH B. (2012). An update of the use of C-reactive protein in early-onset neonatal sepsis: current insights and new tasks. *Neonatology.* 102:25-36.
- HOFFMAN WE, SOLTER PF. (2008). Diagnostic enzymology of domestic animals. En: *Clinical biochemistry of domestic animals.* Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, Eds. Elsevier Inc. pp. 351-378.
- HOOIJBERG EH, VAN DEN HOVEN R, TICHY A, SCHWENDENWEIN I. (2014). Diagnostic and predictive capability of routine laboratory tests for the diagnosis and staging of equine inflammatory disease. *J Vet Intern Med.* 28(5):1587-1593.
- HULTÉN C, DEMMERS S. (2002). Serum amyloid A (SAA) as an aid in the management of infectious disease in the foal: comparison with total leucocyte count, neutrophil count and fibrinogen. *Equine Vet J.* 34(7):693-698.
- HULTÉN C, GRÖNLUND U, HIRVONEN J, TULAMO RM, SUOMINEN MM, MARHAUG G, FORSBERG M. (2002). Dynamics in serum of

the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and alpha2-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. *Equine Vet J.* 34(7):699-704.

HULTÉN C, SLETTEN K, FOYN BRUUN C, MARHAUG G. (1997). The acute phase serum amyloid A protein (SAA) in the horse: isolation and characterization of three isoforms. *Vet Immunol Immunopathol.* 57(3-4):215-227.

HULTÉN C, TULAMO RM, SUOMINEN MM, BURVALL K, MARHAUG G, FORSBERG M. (1999). A non-competitive chemiluminescence enzyme immunoassay for the equine acute phase protein serum amyloid A (SAA) - a clinically useful inflammatory marker in the horse. *Vet Immunol Immunopathol.* 68 (2-4):267-281.

HYYPÄ S, HOYHTYA M, NEVALAINEN M, POSO AR. (2002). Effect of exercise on plasma ferritin concentrations: implications for the measurement of iron status. *Equine Vet J.* 34:186-190.

INOUE Y, MATSUI A, ASAI Y, AOKI F, MATSUI T, YANO H. (2005). Effect of exercise on iron metabolism in horses. *Biol Trace Elem Res.* 107(1):33-42.

JACOBSEN LS, LOBETTI RC. (1996). Rhabdomyolysis as a complication of canine babesiosis. *J Small Anim Pract.* 37(6):286-291.

JACOBSEN S, ANDERSEN PH. (2007). The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equine Vet. Educ.* 19(1):38-46.

JACOBSEN S, JENSEN JC, FREI S, JENSEN AL, THOEFNER MB. (2005). Use of serum amyloid A and other acute phase reactants to monitor the inflammatory response after castration in horses: a field study. *Equine Vet J.* 37(6):552-556.

JACOBSEN S, KJELGAARD-HANSEN M, HAGBARD PETERSEN H, JENSEN AL. (2006). Evaluation of a commercially available human serum amyloid A (SAA) turbidometric immunoassay for determination of equine SAA concentrations. *Vet J.* 172(2):315-319.

JACOBSEN S, LADEFOGED S, BERG LC. (2016). Production of serum amyloid A in equine articular chondrocytes and fibroblast-like synoviocytes treated with proinflammatory cytokines and its effects on the two cell types in culture. *Am J Vet Res.* 77(1):50-58.

JACOBSEN S, NIELSEN JV, KJELGAARD-HANSEN M, TOELBOELL T, FJELDBORG J, HALLING-THOMSEN M, MARTINUSSEN T, THOEFNER MB. (2009). Acute phase response to surgery of varying intensity in horses: a preliminary study. *Vet J.* 38(6):762-769.

JACOBSEN S, THOMSEN MH, NANNI S. (2006). Concentrations of serum amyloid A in serum and synovial fluid from healthy horses and horses with joint disease. *Am J Vet Res.* 67(10):1738-1742.

JACOBSEN S. (2007). Review of equine acute phase proteins. En: American Association of Equine Practitioners Convention, Orlando, USA.

- JACOBSON LS, CLARK IA. (1994). The pathophysiology of canine babesiosis: new approaches to an old puzzle. *J S Afr Vet Assoc.* 5(3):134-145.
- JACOBSON LS, LOBETTI RG, BECKER P, REYERS F, VAUGHAN-SCOTT T. (2002). Nitric oxide metabolites in naturally occurring canine babesiosis. *Vet J.* 104(1):27-41.
- JOHNSTON RB. (1988). Monocytes and macrophages. *N Engl J Med.* 318:747-751.
- KANEKO JJ. (1980). Iron metabolism. En: *Clinical biochemistry of domestic animals.* Kaneko JJ, Ed. 3rd. ed., Academic Press. New York, pp. 649-669.
- KARATEPE B, KARATEPE M, CAKMAK A, KARAER Z, ERGUN G. (2009). Investigation of seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Nigde province, Turkey. *Trop Anim Health Prod.* 41(1):109-113.
- KEMNA E, PICKKERS P, NEMETH E, VAN DER HOEVEN H, SWINKELS D. (2005). Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood.* 106(5):1864-1866.
- KENT J. (1992). Acute phase proteins: their use in veterinary diagnosis. *Br Vet J.* 148(4):279-282.
- KIM CM, BLANCO 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(2):158-163.
- KNOWLES RC. (1988). Equine babesiosis: epidemiology, control and chemotherapy. *J Equine Vet Sci.* 8:61-64.
- KOJ A. (1989). The role of interleukin-6 as the hepatocyte stimulating factor in the network of inflammatory cytokines. *Ann N Y Acad Sci.* 557:1-8.
- KOJ A. (1996). Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochim Biophys Acta.* 1317(2):84-94.
- KONSMAN JP, VEENEMAN J, COMBE C, POOLE S, LUHESHI GN, DANTZER R. (2008). Central nervous action of interleukin-1 mediates activation of limbic structures and behavioural depression in response to peripheral administration of bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Neurosci.* 28(12):2499-2510.
- KOUAM MK, KANTZOURA V, GAJADHAR AV, THEIS JH, PAPADOPOULOS E, THEODOROPOULOS G. (2010). Seroprevalence of equine piroplasms and host-related factors associated with infection in Greece. *Vet. Parasitol.* 169:273-278.
- KRAJE AC. (2001). Canine haemobartonellosis and babesiosis. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 23:310-319.
- KRAKOWSKI L, KRAWCZYK CH, KOSTRO K, STEFANIAK T, NOVOTNY F, OBARA J. (2011). Serum levels of acute phase proteins:

- SAA, Hp and progesterone (P4) in mares with early embryonic death. *Reprod Domest Anim.* 46(4):624-629.
- KRISTENSEN L, BUHL R, NOSTELL K, BAK L, PETERSEN E, LINDHOLM M, JACOBSEN S. (2014). Acute exercise does not induce an acute phase response (APR) in Standardbred trotters. *Can J Vet Res.* 78(2):97-102.
- KUMAR S, KUMAR R, GUPTA AK, DWIVEDI SK. (2008). Passive transfer of *Theileria equi* antibodies to neonate foals of immune tolerant mares. *Vet Parasitol.* 151 (1):80-85.
- KUMAR S, KUMAR R, SUGIMOTO C. (2009). A perspective on *Theileria equi* infections in donkeys. *Jpn J Vet Res.* 56(4):171-180.
- KUSHNER I. (1982). The phenomenon of the acute phase response. *Ann N Y Acad Sci.* 389:39-48.
- KUSHNER I. (1993). Regulation of the acute phase response by cytokines. *Perspect Biol Med.* 36(4):611-622.
- KUTTLER KL, GIPSON CA, GOFF WL, JOHNSON LW. (1986). Experimental *Babesia equi* infection in mature horses. *Am J Vet Res.* 47(8):1668-1670.
- LASSEN ED, SWARDSON CJ. (1995). Hematology and hemostasis in the horse: normal functions and common abnormalities. *Vet Clin North Am: Equine Pract.* 11(3):351-389.
- LAUS F, SPATERNA A, FAILLACE V, VERONESI F, RAVAGNAN S, BERIBÉ F, CERQUETELLA M, MELIGRANA M, TESEI B. (2015). Clinical investigation in *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Italian donkeys. *BMC Vet Res.* 11:100. Doi:10.1186/s12917-015-0411-7
- LAVOIE-LAMOUREAUX A, LECLERE M, LEMOS K, WAGNER B, LAVOIE JP. (2012). Markers of systemic inflammation in horses with heaves. *J Vet Intern Med* 26(6):1419-1426.
- LECLERE M, LAVOIE-LAMOUREUX A, LAVOIE JP. (2015). Acute phase proteins in racehorses with inflammatory airway disease. *J Vet Intern Med.* 29(3):940-945.
- LENNIE TA, MCCARTHY DO, KEESEY RE. (1995). Body energy status and the metabolic response to acute inflammation. *Am J Physiol.* 269(5, Pt2): R1024-R1031.
- LEVI M, VAN DER POLL T. (2005). Two way interactions between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovas Med.* 15:254-259.
- LEWIS BD, PENZHORN BL, VOLKMANN DH. (1999). Could treatment of pregnant mares prevent abortions due to equine piroplasmiasis? *J S Afr Vet Assoc.* 70:90-91.
- LILLIEHÖÖK I, JOHANNISSON A, MAGNUSSON U, EGENVALL A, TROWALDWIGH G, HÅKANSSON L. (1998). Granulocyte function in dog experimentally infected with a Swedish granulocytic *Ehrlichia* species. *Vet Immunol Immunopathol.* 67(2):141-152.

- LINDEMANN S, TOLLEY ND, DIXON DA, MCINTYRE TM, PRESCOTT SM, ZIMMERMAN GA, WEYRICH AS. (2001). Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1B synthesis. *J Cell Biol.* 154:485-490.
- LINDSAY WA, ROBINSON GM, BRUNSON DB, MAJORS LI. (1989). Induction of equine postanesthetic myositis after halothane-induced hypotension. *Am J Vet Res.* 50:404-410.
- LIPPI G, SALVAGNO GL, MONTAGNANA M, BROCCO G, GUIDI CG. (2006). Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med.* 44(3):311-316.
- LISTE F, GASCÓN M, MOLINA M, SORIANO J. (1995). What is your diagnosis? Intestinal obstruction due to intussusception in a dog. *J Small Anim Pract.* 36(11):491-492
- LOBETTI RG, MÖHR AJ, DIPPENAAR T, MYBURGHE. (2000). A preliminary study on the serum protein response in canine babesiosis. *J S Afr Vet Assoc.* 71(1):38-42.
- LOBETTI RG. (2005). Cardiac involvement in canine babesiosis. *J S Afr Vet Assoc.* 76(1):4-8.
- LORDING PM. (2008). Erythrocytes. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 24(2):225-237.
- LUCROY MD, MADEWELL BR. (1999). Clinical outcome and associated disease in dogs with leukocytosis and neutrophilia: 118 cases. (1996–1998). *J Am Vet Med Assoc.* 214:805-807.
- LUCROY MD, MADEWELL BR. (2001). Clinical outcome and disease associated with extreme neutrophilic leukocytosis in cats 104 cases (1991–1999). *J Am Vet Med Assoc.* 218:736-739.
- LUDWIG EK, BRANDON WIESE R, GRAHAM MR, TYLER AJ, SETTLAGE JM, WERRE SR, PETERSSON-WOLFE CS, KANEVSKY-MULLARKY I, DAHLGREN LA. (2016). Serum and synovial fluid serum amyloid A response in equine models of synovitis and septic arthritis. *Vet Surg.* 45(7):859-867.
- ŁUKASZYK E, ŁUKASZYK M, KOC-ŻÓRAWSKA E, TOBOLCZYK J, BODZENTA-ŁUKASZYK A, MAŁYSZKO J. (2015). Iron status and inflammation in early stages of chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res.* 40(4):366-373.
- MAHMMOD YS, ELBALKEMY FA, KLAAS IC, ELMEKKAWY MF, MONAZIE AM. (2011). Clinical and haematological study on water buffaloes (*Bubalus bubalis*) and crossbred cattle naturally infected with *Theileria annulata* in Sharkia province, Egypt. *Ticks Tick Borne Dis.* 2(3):168-171.
- MAHMOUD MS, EL-EZZ NT, ABDEL-SHAFY S, NASSAR SA, EL NAMAKY AH, KHALIL WK, KNOWLES D, KAPPMAYER L, SILVA MG, SUAREZ CE. (2016). Assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in equine populations in Egypt by molecular, serological and hematological approaches. *Parasit Vectors.* 4:260.

- MALLE E, BOLLMANN A, STEINMETZ A, GEMSA D, LEIS HJ, SATTLER W. (1997). Serum amyloid A (SAA) protein enhances formation of cyclooxygenase metabolites of activated human monocytes. *FEBS Lett.* 419(2-3):215-219.
- MALMSTRÖM BG, HALLBERG L, HARWERTH HG, VANNOTI A. (1970). Biochemical functions of iron. Iron deficiency. London: Academic Press, pp. 9-20.
- MARCHETTI V, LUBAS G, LOMBARDO A, CORAZZA M, GUIDI G, CARDINI G. (2010). Evaluation of erythrocytes, platelets, and serum iron profile in dogs with chronic enteropathy. *Vet Med Int.* 28, pii: 716040.
- MARTÍNEZ-SUBIELA S, BERNAL LJ, CERÓN JJ. (2003). Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment. *Am J Vet Res.* 64(8):1021-1026.
- MARTINEZ-SUBIELA S, PARDO-MARÍN L, TECLES F, BANETH G, CERÓN JJ. (2016). Serum C-reactive protein and ferritin concentrations in dogs undergoing leishmaniosis treatment. *Res Vet Sci.* 109:17-20.
- MARTÍNEZ-SUBIELA S, TECLES F, ECKERSALL PD, CERÓN JJ. (2002). Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniosis. *Vet Rec.* 150(8):241-244.
- MÁTHÉ A, VÖRÖS K, PAPP L, REICZIGEL J. (2006). Clinical manifestations of canine babesiosis in Hungary (63 cases). *Acta Vet Hung.* 54(3):367-385.
- MATIJATKO V, MRLJAK V, KIS I, KUCER N, FORSEK J, ZIVICNJAK T, ROMIC Z, SIMEC Z, CERON JJ (2007). Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Vet. Parasitol.* 144(3-4):242-250.
- MCCOWN JL, SPECHT DJ. (2011). Iron homeostasis and disorders in dogs and cats: a review. *J Am Anim Hosp Assoc.* 47(3):151-160.
- MCDONALD TL, LARSON MA, MACK DR, WEBER A. (2001). Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum. *Vet Immunol Immunopathol.* 83(3-4):203-211.
- MCGOVERN KF, LASCOLA KM, SMITH SA, CLARK-PRICE SC, MCMICHAEL M, WILKINS PA. (2012). Assessment of acute moderate hyperglycemia on traditional and thromboelastometry coagulation parameters in healthy adult horses. *J Vet Emer Crit Care.* 22:550-557.
- MCGUIRE TC, VAN HOOSIER GL JR, HENSON JB. (1971). The complement-fixation reaction in equine infectious anemia: demonstration of inhibition by IgG (T). *J Immunol.* 107:1738-1744.
- MEANS RT. (2004). Hepcidin and cytokines in anaemia. *Hematology.* 9(5-6):357-362.
- MÉNDEZ JC, CARRETÓN E, MARTÍNEZ S, TVARIJONAVICIUTE A, CERÓN JJ, MONTOYA-ALONSO JA. (2014). Acute phase response in dogs with *Dirofilaria immitis*. *Vet Parasitol.* 204(3-4):420-425.

- MÉNDEZ-ANGULO JL, MUDGE M, ZALDIVAR-LOPEZ S, VILAR-SAAVEDRA P, COUTO G. (2011). Thromboelastography in healthy, sick non-septic and septic neonatal foals. *Aust Vet J.* 89(12):500-505.
- MENZIES-GOW NJ, WRAY H, BAILEY SR, HARRIS PA, ELLIOTT J. (2014). The effect of exercise on plasma concentrations of inflammatory markers in normal and previously laminitic ponies. *Equine Vet J.* 46(3):317-321.
- MILLS PC, AUER DE, KRAMER H, BARRY D, NG JC. (1998). Effects of inflammation-associated acute-phase response on hepatic and renal indices in the horse. *Aust Vet J.* 76(3):187-194.
- MOLD C, BACA R, DU CLOS TW. (2002). Serum amyloid P component and C-reactive protein opsonize apoptotic cells for phagocytosis through Fc gamma receptors. *J Autoimmun.* 19(3):147-154.
- MONTOYA CJ, OLIVARES M, CARDONA R. (2003). Regulación del tráfico celular en la inflamación: moléculas de adhesión y quimioquinas. *Rev Asoc Colomb Alerg Inmunol.* 11(4):136-153.
- MORETTI A, MANGIL A, 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. *Vet J.* 184(3):346-350.
- MORTENSEN RF, ZHONG W. (2000). Regulation of phagocytic leukocyte activities by C-reactive protein. *J Leukoc Biol.* 67(4):495-500.
- MUJICA FF, PERRONE T, FORLANO M, CORONADO A, MELÉNDEZ RD, BARRIOS N, ALVAREZ R, GRANDI F. (2011). Serological prevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses of Lara State, Venezuela. *Vet Parasitol.* 178:180-183.
- MUNKHJARGAL T, YOKOYAMA N, IGARASHI I, TERKAWI MA, BYAMBAA B, BAYARSAIKHAN D, BYAMBAA B, TERKAWI MA, YOKOYAMA N, IGARASHI I. (2013). Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province, Mongolia. *Infect Genet Evol.* 16:178-185.
- MUÑOZ A, RIBER C, TRIGO P, CASTEJÓN F. (2012). Age- and gender-related variations in hematology, clinical biochemistry, and hormones in Spanish fillies and colts. *Res Vet Sci.* 93(2):943-949.
- MUÑOZ A, RODRÍGUEZ RGM, RIBER C, TRIGO P, GÓMEZ-DÍEZ M, CASTEJÓN F. (2013). Subclinical *Theileria equi* infection and rhabdomyolysis in three endurance horses. *Pak Vet J.* 33(2): 256-258.
- MURASE T, MAEDE Y. (1990). Increased erythrophagocytic activity of macrophages in dogs with *Babesia gibsoni* infection. *Nihon Juigaku Zasshi.* 52(2):321-327.
- MURATA H, MIYAMOTO T. (1993). Bovine haptoglobin as a possible immunomodulator in the

- sera of transported calves. *Br Vet J.* 149(3):277-283.
- MURATA H, SHIMADA N, YOSHIOKA M. (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J.* 168:28-40.
- NAKAMURA M, TAKAHASHI M, OHNO K, KOSHINO A, NAKASHIMA K, SETOGUCHI A, FUJINO Y, TSUJIMOTO H. (2008). C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *J Vet Med Sci.* 70(2):127-131.
- NAZIFI S, RAZAVI SM, ESMAILNEJAD Z, GHEISARI H. (2009). Study on acute phase proteins (haptoglobin, serum amyloid A, fibrinogen and ceruloplasmin) changes and their diagnostic values in bovine tropical theileriosis. *Parasitol Res.* 105(1):41-46.
- NEMETH E, RIVERA S, GABAYAN V, KELLER C, TAUDORF S, PEDERSEN BK, GANZ T. (2004). IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest.* 113(9):1271-1276.
- NIELSEN MK, BETANCOURT A, LYONS ET, HOROHOV DW, JACOBSEN S. (2013). Characterization of the inflammatory response to anthelmintic treatment of ponies with cyathostomiasis. *Vet J.* 198(2):457-462.
- NIELSEN MK, VIDYASHANKAR AN, GRAVATTE HS, BELLAW J, LYONS ET, ANDERSEN UV. (2014). Development of *Strongylus vulgaris*-specific serum antibodies in naturally infected foals. *Vet Parasitol.* 200(3-4):265-270.
- NUNOKAWA Y, FUJINAGA T, TAIRA T, OKUMURA M, YAMASHITA K, TSUNODA N, HAGIO M. (1993). Evaluation of serum amyloid A protein as an acute-phase reactive protein in horses. *J Vet Med Sci.* 55(6):1011-1016.
- O'BRIEN M. (2012). The reciprocal relationship between inflammation and coagulation. *Top Compan Anim Med.* 27(2):46-52.
- OKUMURA M, FUJINAGA T, YAMASHITA K, TSUNODA N, MIZUNO S. (1991). Isolation, characterization, and quantitative analysis of ceruloplasmin from horses. *Am J Vet Res.* 52(12):1979-1985.
- OMER OH, EL-MALIK KH, MAHMOUD OM, HAROUN EM, HAWAS A, SWEENEY D, MAGZOUN M. (2002). Haematological profiles in purebred cattle naturally infected with *Theileria annulata* in Saudi Arabia. *Vet Parasitol.* 107(1-2):161-168.
- OSMAN SA, AL-GAABARY MH. (2007). Clinical, haematological and therapeutic studies on tropical theileriosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Egypt. *Vet Parasitol.* 146(3-4):337-340.
- PAGÉS JP, VIDOR E, TROUILLEK JL, BISSUEL G, LECOINTRE O, MOREAU Y. (1990). Description clinique, hématologique et sérologique de 133 case de babésiose canine. *Pract Med Chir Anim Comp.* 25, 89-97.

- PALADINO B, RUBINO G, LACINIO R, PETAZZI F. (2016). A new classification to diagnose type of anemia in Standardbred horses: a retrospective study. *J Equine Vet Sci.* 44:21-25.
- PALTRINIERI S, GIORDANO A, VILLANI M, MANFRIN M, PANZANI S, VERONESI MC. (2008). Influence of age and foaling on plasma protein electrophoresis and serum amyloid A and their possible role as markers of equine neonatal septicemia. *Vet J.* 176(3):393-396.
- PARASHAR R, SUDAN V, JAISWAL AK, SHANKER D. (2016). Variation in clinical markers in cattle naturally infected with bovine tropical theileriosis. *J Parasit Dis.* 40(4):1532-1534.
- PASSAMONTI F, VARDI DM, STEFANETTI V, MARENZONI ML, PRATO S, CÉVESE P, COLETTI M, PEPE M, CASAGRANDE PROIETTI P, OLEA-POPELKA F. (2015). *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: an assessment of the early diagnostic value of serum amyloid A and plasma fibrinogen concentrations in equine clinical practice. *Vet J.* 203(2):211-218.
- PASTERNAK Y, LIVNI G, ASHKENAZI S, LOWENTHAL A, YARDEN-BILAVSKY H. (2016). Extremely elevated C-reactive protein levels are associated with unfavourable outcomes, including death, in paediatric patients. *Acta Paediatr.* 105(1):e17-21.
- PATIL S, DUTTA S, ATTRI SV, RAY P, KUMAR P. (2016). Serial C reactive protein values predict sensitivity of organisms to empirical antibiotics in neonates: a nested case-control study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 29. pii: fetalneonatal-2015-309158.
- PATTERSON SD, AUER D, BELL K. (1988). Acute phase response in the horse: plasma protein changes associated with adjuvant induced inflammation. *Biochem Int.* 17(2):257-264.
- PEEK SF, SEMRAD S, MCGUIRK SM, RISEBERG A, SLACK JA, MARQUES F, COOMBS D, LIEN L, KEULER N, DARIEN BJ. (2006). Prognostic value of clinicopathologic variables obtained at admission and effect of antiendotoxin plasma on survival in septic and critically ill foals. *J Vet Intern Med.* 20(3):569-574.
- PENG J, FRIESE P, WOLF RF, HARRISON P, DOWNS T, LOK S, DALE GL, BURSTEIN SA. (1996). Relative reactivity of platelets from thrombopoietin and interleukin-6 treated dogs. *Blood.* 87:4158-4163.
- PEPYS MB, BALTZ ML, TENNENT GA, KENT J, OUSEY J, ROSSDALE PD. (1989). Serum amyloid A protein (SAA) in horses: objective measurement of the acute phase response. *Equine Vet J.* 21(2):106-109.
- PEPYS MB, HIRSCHFIELD GM. (2003). C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* 111:1805-1812.
- PETERSEN HH, NIELSEN JP, HEEGAARD PM. (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res.* 35(2):163-187.

- PHIPPS IP. (1996) Equine piroplasmiasis. *Equine Vet Educ.* 8:33-36.
- PHIPPS LP, OTTER A. (2004). Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. *Vet Rec.* 154:406-408.
- PIAGNERELLI M1, COTTON F, HERPAIN A, RAPOTEC A, CHATTI R, GULBIS B, VINCENT JL. (2013). Time course of iron metabolism in critically ill patients. *Acta Clin Belg.* 68(1):22-27.
- PIANTEDOSI D, D'ALESSIO N, DI LORIA A, DI PRISCO F, MARIANI U, NEOLA B, SANTORO M, MONTAGNARO S, CAPELLI G, VENEZIANO V. (2014). Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in donkeys from Southern Italy. *Vet J.* 202(3):578-582.
- PIHL TH, SCHEEPERS E, SANZ M, GODDARD A, PAGE P, TOFT N, ANDERSEN PH, JACOBSEN S. (2015). Influence of disease process and duration on acute phase proteins in serum and peritoneal fluid of horses with colic. *J Vet Intern Med.* 29(2):651-658.
- PIHL TH, SCHEEPERS E, SANZ M, GODDARD A, PAGE P, TOFT N, KJELGAARD-HANSEN M, ANDERSEN PH, JACOBSEN S. (2016). Acute-phase proteins as diagnostic markers in horses with colic. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 26(5):664-674.
- POLLOCK PJ, PRENDERGAST M, SCHUMACHER J, BELLENGER CR. (2005). Effects of surgery on the acute phase response in clinically normal and diseased horses. *Vet Rec.* 156(17):538-542.
- POTGIETER FT, DE WAAL DT, POSNETT ES. (1992). Transmission and diagnosis of equine babesiosis in South Africa. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 87 Suppl 3:139-142.
- PRINS M, SCHELLENS CJ, VAN LEEUWEN MW, ROTHUIZEN J, TESKE E. (2010). Coagulation disorders in dogs with hepatic disease. *Vet J.* 185(2):163-168.
- RADAKOVIC M, DAVITKOV D, BOROZAN S, STOJANOVIC S, STEVANOVIC J, KRSTIC V, STANIMIROVIC Z. (2016). Oxidative stress and DNA damage in horses naturally infected with *Theileria equi*. *Vet J.* 217:112-118.
- RAFAJ RB, KULEŠ J, SELANEC J, VRKIĆ N, ZOVKO V, ZUPANČIČ M, TRAMPUŠ BAKIJA A, MATIJATKO V, CRNOGAJ M, MRLJAK V. (2013). Markers of coagulation activation, endothelial stimulation, and inflammation in dogs with babesiosis. *J Vet Intern Med.* 27(5):1172-1178.
- RAFAJ RB, MATIJATKO V, KIS I, KUCER N, ZIVICNJAK T, LEMO N, ZVORC Z, BRKLJACIC M, MLRLJAK V. (2009). Alterations in some blood coagulation parameters in naturally occurring cases of canine babesiosis. *Acta Vet Hung.* 57(2):295-304.
- RANNEY HM, RAPAPORT SI. (1990). The red blood cell. En: Best and Taylor's Physiological

- basis of Medical practice. 12th ed., Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 369-384.
- RAPOPORT A, AHARONSON-RAZ K, BERLIN D, TAL S, GOTTLIEB Y, KLEMENT E, STEINMAN A. (2014). Molecular characterization of the *Babesia caballi* rap-1 gene and epidemiological survey in horses in Israel. *Infect Genet Evol.* 23:115-120.
- RENDLE DI, HELLER J, HUGHES KJ, INNOCENT GT, DURHAM AE. (2009). Stability of common biochemistry analytes in equine blood stored at room temperature. *Equine Vet J.* 41(5):428-432.
- ROBERTS ED, MOREHOUSE LG, GAINER JH, McDANIEL HA. (1962). Equine piroplasmosis. *J Am Vet Med Assoc.* 141:1323-1329.
- ROITT I, BROSTOFF J, MALE D. (1991). *Immunologia.* Salvat. Barcelona, pp. 1.1-3.11.
- ROSSBACHER J, WAGNER L, PASTERNAK MS. (1999). Inhibitory effect of haptoglobin on granulocyte chemotaxis, phagocytosis and bactericidal activity. *Scand J Immunol.* 50(4):399-404.
- ROTHSCHILD C, KNOWLES D. (2007). Equine piroplasmosis. En: *Equine infectious diseases* (Sellon DC, Long MT, Ed.). Saunders, Elsevier, St. Louis, MO, pp. 465-473.
- ROTHSCHILD CM. (2013). Equine piroplasmosis. *J Equine Vet Sci.* 33:497-508.
- RUBEL C, FERNÁNDEZ GC, DRAN G, BOMPADRE MB, ISTURIZ MA, PALERMO MS. (2001). Fibrinogen promotes neutrophil activation and delays apoptosis. *J Immunol.* 166(3):2002-2010.
- RUDOLPH W, CORREA J, ZURITA L, MANLEY W. (1975). Equine piroplasmosis: leukocytic response to *Babesia equi* (Laveran, 1901) infection in Chile. *Br Vet J.* 131(5):601-609.
- RUDZINSKA MA, LEWENGRUB S, SPIELMAN A, PIESMAN J. (1983). Invasion of *Babesia microti* into epithelial cells of the tick gut. *J Protozool.* 30(2):338-346.
- RUIZ DE GOPEGUI R, PEÑALBA B, GOICOA A, ESPADA Y, FIDALGO LE, ESPINO L. (2007). Clinico-pathological findings and coagulation disorders in 45 cases of canine babesiosis in Spain. *Vet. J.* 174(1), 129-132.
- SAHNI KS. (2007). Endothelial cell infection and hemostasis. *Thromb Res.* 119:531-549.
- SALEH MA, MAHRAN OM, AL-SALAHY MB. (2011). Corpuscular oxidation in newborn crossbred calves naturally infected with *Theileria annulata*. *Vet Parasitol.* 182(2-4):193-200.
- SALUK-JUSZCZAK J, WACHOWICZ B, KACA W. (1999). Stimulatory effects of endotoxin on the platelet secretory process. *Microbios.* 99:45-53.
- SANDHU GS, GREWAL AS, SINGH A, KONDAL JK, SINGH J, BRAR RS. (1998). Haematological and biochemical studies on experimental *Theileria annulata* infection in

crossbred calves. *Vet Res Commun.* 22(5):347-354.

SCHAER DJ, BORETTI FS, SCHOEDON G, SCHAFFNER A. (2002). Induction of the CD163-dependent haemoglobin uptake by macrophages as a novel anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Br J Haematol.* 119(1):239-243.

SCHETTERS TP, KLEUSKENS JA, VAN DE CROMMET J, DE LEEUW PW, FINIZIO AL, GOREFLOT A. (2009). Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with *Babesia canis*: a haematological study. *Vet Parasitol.* 162(1-2): 7-15.

SCHETTERS TP, MOUBRI K, PRÉCIGOUT E, KLEUSKENS J, SCHOLTES NC, GORENFLOT A. (1997). Different *Babesia canis* isolates, different diseases. *Parasitology.* 115 (Pt 5):485-493.

SCHMIDT EM, KJELGAARD-HANSEN M, THOMAS F, TVARIJONAVICIUTE A, CERÓN JJ, ECKERSALL PD. (2016). Acute phase proteins in dogs naturally infected with the giant kidney worm (*Dioctophyme renale*). *Vet Clin Pathol.* 45(4):657-664.

SCHOEMAN JP. (2009). Canine babesiosis. *Onderstepoort J Vet Res.* 76(1):59-66.

SCHRÖDL W, BÜCHLER R, WENDLER S, REINHOLD P, MUCKOWA P, REIND J, RHODE H. (2016). Acute phase proteins as promising biomarkers: perspectives and limitations for human and veterinary medicine. *Proteomics Clin Appl.* 10(11):1077-1092.

SELAKE MA, CHIGNARD M, SMITH JB. (1988). Cathepsin G is a strong platelet agonist released by neutrophils. *Biochem J.* 251:293-299.

SEVINC F, MADEM M, KUMAS C, SEVINC M, EKICI OD. (2008). A comparative study on the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horses with sub-populations in Turkey. *Vet Parasitol.* 156(3-4):173-174.

SILVA MG, GRAÇA T, SUAREZ CE, KNOWLES DP. (2013). Repertoire of *Theileria equi* immunodominant antigens bound by equine antibody. *Mol Biochem Parasitol.* 188(2):109-115.

SILVESTRINI P, ZOIA A, PLANELLAS M, ROURA X, PASTOR J, CERÓN JJ, CALDIN M. (2014). Iron status and C-reactive protein in canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract.* 55(2):95-101.

SINGH A, SINGH J, GREWAL AS, BRAR RS. (2001). Studies on some blood parameters of crossbred calves with experimental *Theileria annulata* infections. *Vet Res Commun.* 25(4):289-300.

SKIRO M, KROL J, NOWAK M, STEFANIAK T, AUBERTSSON G, KOZDROWSKI R. (2016). The usefulness of uterine lavage and acute phase protein levels as a diagnostic tool for subclinical endometritis in Iceland mares. *Acta Vet Scand.* 58(1):50. Doi:10.1186/s13028-016-0233-4.

SMITH JE, CIPRIANO JE. (1987). Inflammation-induced changes in serum iron analytes and ceruloplasmin of Shetland ponies. *Vet Pathol.* 24(4):354-356.

- SMITH JE, DeBOWES RM, CIPRIANO JE. (1986). Exogenous corticoids increase serum iron concentrations in mature horses and ponies. *J Am Vet Med Assoc.* 188(11):1296-1298.
- SMITH JE. 1989. Iron metabolism and its disorders. En: *Clinical biochemistry of domestic animals*. Kaneko JJ, eds. Kaneko. 4th ed., Academic Press, New York, pp. 256-273.
- SMITH JE. 1992. Iron metabolism in dogs and cats. *Comp Cont Ed.* 1:39-43.
- SOLANO-GALLEGO L, TROTTA M, CARLI E, CARCY B, CALDIN M, FURLANELLO T. (2008). *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Vet Parasitol.* 157(3-4):211-221.
- SOOMRO AY, GUERCHICOFF A, NICHOLS DJ, SULEMAN J, DANGAS GD. (2016). The current role and future prospects of D-dimer biomarker. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother.* 2(3):175-184.
- STEINBACH T, BAUER C, SASSE H, BAUMGÄRTNER W, REY-MORENO C, HERMOSILLA C, DAMRIYASA IM, ZAHNER H. (2006). Small strongyle infection: consequences of larvicidal treatment of horses with fenbendazole and moxidectin. *Vet Parasitol.* 139(1-3):115-131.
- 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. *Vet Parasitol.* 187(3-4):558-562.
- STONEHAM SJ, PALMER L, CASH R, ROSSDALE PD. (2001). Measurement of serum amyloid A in the neonatal foal using a latex agglutination immunoturbidimetric assay: determination of the normal range, variation with age and response to disease. *Equine Vet J.* 33(6):599-603.
- SUDHAKARA REDDY B, SIVAJOTHI S, VARAPRASAD REDDY LS, SOLMON RAJU KG. (2016). Clinical and laboratory findings of *Babesia infection* in dogs. *J Parasit Dis.* 40(2):268-272.
- SUMBRIA D, SINGLA LD, KUMAR S, SHARMA A, DAHIYA RK, SETIA R. (2016). Spatial distribution, risk factors and haemato-biochemical alterations associated with *Theileria equi* infected equids of Punjab (India) diagnosed by indirect ELISA and nested PCR. *Acta Trop.* 155:104-112.
- TABOADA J, LOBETTI R. (2006). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Saunders Elsevier, Philadelphia, p. 722.
- TACKE F, NURALDEEN R, KOCH A, STRATHMANN K, HUTSCHENREUTER G, TRAUTWEIN C, STRNAD P. (2016). Iron parameters determine the prognosis of critically ill patients. *Crit Care Med.* 44(6):1049-1058.

- TAIRA T, FUJINAGA T, TAMURA K, IZUMI M, ITOH H, TSUNODA N, YAMASHITA K, OKUMURA M, MIZUNO S. (1992). Isolation and characterization of alpha 1-acid glycoprotein from horses, and its evaluation as an acute-phase reactive protein in horses. *Am J Vet Res.* 53(6):961-965.
- TAKIGUCHI M, FUJINAGA T, NAIKI M, MIZUNO S, OTOMO K. (1990). Isolation, characterization, and quantitative analysis of C-reactive protein from horses. *Am J Vet Res.* 51(8):1215-1220.
- TAMZALI Y, GUELFY JF, BRAUN JP. (2001). Plasma fibrinogen measurement in the horse: comparison of Millar's technique with a chronometric technique and the QBC-Vet Autoreader. *Res Vet Sci* 71(3):213-217.
- TAMZALI Y. (2013). Equine piroplasmiasis: an updated review. *Equine Vet Educ.* 25(11):590-598.
- TASAKI Y, MIURA N, IYORI K, NISHIFUJI K, ENDO Y, MOMOI Y. (2013). Generalized alopecia with vasculitis-like changes in a dog with babesiosis. *J Vet Med Sci.* 75(10):1367-1369.
- TAYLOR LJ. (2003). Laboratory management of the bleeding patient. *Clin Lab Sci.* 16:111-114.
- TAYLOR WM, BRYANT JE, ANDERSON JB, WILLERS KH. (1968). Equine piroplasmiasis in the United States-a review. *J Am Vet Med Assoc.* 155(6):915-919.
- TEN BOEKEL E, BÖCK M, VRIELINK GJ, LIEM R, HENDRIKS H, DE KIEVIET W. (2007). Detection of shortened activated partial thromboplastin times: an evaluation of different commercial reagents. *Thromb Res.* 121(3):361-367.
- THAWLEY VJ, SÁNCHEZ MD, DROBATZ KJ, KING LG. (2016). Retrospective comparison of thromboelastography results to postmortem evidence of thrombosis in critically ill dogs: 39 cases (2005-2010). *Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 26(3):428-436.
- TIZARD I. (1987). *Inmunología veterinaria.* Interamericana. Mexico.
- TIZARD IR. (1996). *Veterinary immunology: an introduction.* 5th ed. WB Saunders, Philadelphia, USA, pp 316-321.
- TONIAL CT, GARCIA PC, SCHWEITZER LC, COSTA CA, BRUNO F, FIORI HH, EINLOFT PR, GARCIA RB, PIVA JP. (2017). Cardiac dysfunction and ferritin as early markers of severity in pediatric sepsis. *J Pediatr (Rio J).* 24.
- TURŁO A, CYWIŃSKA A, CZOPOWICZ M, WITKOWSKI L, NIEDŹWIEDŹ A, SŁOWIKOWSKA M, BOROWICZ H, JAŚKIEWICZ A, WINNICKA A. (2016). The effect of different types of musculoskeletal injuries on blood concentration of serum amyloid A in thoroughbred racehorses. *PLoS One.* 10 (10).
- TURŁO A, CYWINSKA A, CZOPOWICZ M, WITKOWSKI L, SZARSKA E, WINNICKA A. (2015). Post-exercise dynamics of serum amyloid

A blood concentration in thoroughbred horses classified as injured and non-injured after the race. *Res Vet Sci.* 100:223-225.

UETI MW, PALMER GH, SCOLES GA, KAPPMAYER LS, KNOWLES DP. (2007). Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the Apicomplexa parasite *Babesia equi*. *Infect Immunol.* 8:3525-3529.

UHLAR CM, WHITEHEAD AS. (1999). Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem.* 265(2):501-523.

UILENBERG G. (2006) Babesia-a historical overview. *Vet Parasitol.* 138(1-2):3-10.

ULUTAS B, BAYRAMBI G, ULUTAS PA, KARAGENIC T. (2005). Serum concentration of some acute phase proteins in naturally occurring canine babesiosis: a preliminary study. *Vet Clin Pathol.* 34(2):144-147.

VALENTINE BA. (2003). Serum CK and AST in equine neuromuscular disease: searching for diagnostic approaches. *Equine Vet Educ.* 15(5):250-252.

VAN DER POLL T, DE BOER JD, LEVI M. (2011). The effect of inflammation on coagulation and vice versa. *Curr Opin Infect Dis.* 24(3):273-278.

VARMA KJ, POWERS TE, POWERS JD, SPURLOCK SL. (1984). Standardization of an experimental disease model of *Streptococcus*

zooepidemicus in the equine. *J Vet Pharmacol Ther.* 7(3):183-188.

VERCAMMEN F, BERKVENNS D, LE RAY D, JACQUET D, VERVOORT T. (1997). Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. *Vet Rec.* 141(13):328-330.

VERSCHUUR M, VAN DER BEEK MT, TAK HS, VISSER LG, DE MAAT MP. (2004). Interindividual variation in the response by fibrinogen, C-reactive protein and interleukin-6 to yellow fever vaccination. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 15(5):399-404.

VIEIRA RF, BIONDO AW, NASCIMENTO DD, VIEIRA TS, FINGER MA, 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 Parana State, southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 4(6):537-541.

VILJOEN A, SAULEZ MN, DONNELLAN CM, BESTER L, GUMMOW B. (2009). After-hours equine emergency admissions at a university referral hospital (1998–2007): causes and interventions. *J S Afr Vet Assoc.* 80:169-173.

VINCENT JL, DE BACKER D. (2005). Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis. *Crit Care.* 9(4):S9-S12.

WAGENER FA, ABRAHAM NG, VAN KOOYK Y, DE WITTE T, FIGDOR CG. (2001). Heme-

induced cell adhesion in the pathogenesis of sickle-cell disease and inflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 22(2):52-54.

WEBSTER NR. (2002). Inflammation and the coagulation system. *Br J Anesth.* 89:216-220.

WEEKS BR, SMITH JE, NORTHROP JK. (1989). Relationship of serum ferritin and iron concentrations and serum total iron-binding capacity to nonheme iron stores in dogs. *Am J Vet Res.* 50:198-200.

WEIDMEYER CE, SOLTER PF. (1996). Validation of human haptoglobin immunoturbidimetric assay for detection of haptoglobin in equine and canine serum and plasma. *Vet Clin Pathol.* 25(4):141-146.

WEILAND G. (1986). Species-specific serodiagnosis of equine piroplasmas infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Vet Parasitol.* 20:43-48.

WEISS G. (2011). Iron in the inflamed gut: another pro-inflammatory hit? *Gut.* 60(3):287-288.

WELLES EG. (2010). Interpretation of equine leukocyte. En: *Schalm's Veterinary Hematology.* Weiss DJ, Wardrop J. eds. Wiley-Blackwell, pp. 314-321.

WEST JB. (1989). Inflammation and phagocytosis. En: *Physiological basis of medical*

practice. West JB, eds. Williams and Wilkins. Baltimore, pp. 362- 368.

WESTERMAN TL, TORNQUIST SJ, FOSTER CM, POULSEN KP. (2015). Evaluation of serum amyloid A and haptoglobin concentrations as prognostic indicators for horses with inflammatory disease examined at a tertiary care hospital. *Am J Vet Res.* 76(10):882-888.

WISE LN, KAPPMAYER LS, MEALEY RH, KNOWLES DP. (2013). Review of equine piroplasmiasis. *J Vet Intern Med.* 27:1334-1346.

WISE LN, PETZEL-MCCLUSKWKY AM, MEALEY RH, KNOWLES DP. (2014). Equine piroplasmiasis. *Vet Clin North Am: Equine Pract.* 30(3):677-693.

XIE Y, LI Y, ZHANG Q, STILLER MJ, WANG CL, STREILEIN JW. (2000). Haptoglobin is a natural regulator of Langerhans cell function in the skin. *J Dermatol Sci.* 24(1):25-37

YAMASHITA K, FUJINAGA T, OKUMURA M, TAKIGUCHI M, TSUNODA N, MIZUNO S. (1991). Serum C-reactive protein (CRP) in horses: the effect of aging, sex, delivery and inflammations on its concentration. *J Vet Med Sci.* 53(6):1019-1024.

YANG F, HAILE DJ, BERGER FG, HERBERT DC, VAN BEVEREN E, GHIO AJ. (2003). Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284(2):L402-L409.

ZABRECKY KA, SLOVIS NM, CONSTABLE PD, TAYLOR SD. (2015). Plasma C-reactive protein and haptoglobin concentrations in critically ill neonatal foals. *J Vet Intern Med.* 29(2):673-677.

ZALDÍVAR-LÓPEZ S, IAZBIK MC, MARÍN LM, COUTO CG. (2014). Iron status in blood donor dogs. *J Vet Intern Med.* 28(1):211-214.

ZIMMERMAN GA, MCINTYRE TM, PRESCOTT SM, STAFFORINI DM. (2002). The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and

thrombosis. *Crit Care Med.* 30(5 Suppl):S294-S301.

ZOBBA R, ARDU M, NICCOLINI S. (2008). Clinical and laboratory findings in equine piroplasmiasis. *J Equine Vet Sci.* 28:301-308.

ZYGNER W, RAPACKA G, GÓJSKA-ZYGNER O, DŁUGOSZ E, WEDRYCHOWICZ H. (2007). Biochemical abnormalities observed in serum of dogs infected with large *Babesia* in Warsaw (Poland). *Pol J Vet Sci.* 10(4):245-253.



10. ESTUDIO II

**Estudio Epidemiológico, Clínico,
Laboratorial, Diagnóstico y de
Tratamiento en Caballos Afectados por
Theileria equi en Andalucía**

10.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se han llevado a cabo numerosos estudios que han analizado los factores de riesgo para la infección por *Theileria equi* en el caballo, generalmente de forma simultánea a las investigaciones epidemiológicas. Entre los más interesantes, sobre todo porque se han realizado en zonas de climatología similar a la nuestra, tenemos los efectuados por Kouam et al. (2010), en Grecia, Abutarbush et al. (2012) en Jordania, Steinman et al. (2012) en Israel, Piantedoti et al. (2014) y Zanet et al. (2017), en el sur de Italia, Guidi et al. (2015) en el sur de Francia, Bartolomé del Pino et al. (2016) en la zona central y sur de Italia, Davitkov et al. (2016) en el centro de los Balcanes, Ferreira et al. (2016) en Brasil y particularmente, García-Bocanegra et al. (2013). Este último estudio se ha llevado a cabo en la misma zona que nosotros, en Andalucía. El objetivo común de todas estas investigaciones fue la identificación de los factores de riesgo, para intentar reducir la incidencia y las consecuencias clínicas de la infección. El establecimiento de los factores de riesgo relativos a la infección para cada tipo de piroplasma, y de forma específica para una zona determinada, es esencial para el desarrollo y mejora del diseño de programas de control y prevención, para mantener la salud de los animales y limitar las futuras consecuencias económicas derivadas de la patología.

Con ello se persigue la implementación de programas de control específicos, basados en factores de riesgo locales conocidos, con la adopción de prácticas adecuadas, incluyendo el control de garrapatas, el uso de la tierra y el adecuado manejo de los équidos. Tales medidas preventivas ayudarían a limitar las intervenciones farmacológicas, ventajosas tanto para los équidos como para reducir la probabilidad de establecer resistencia parasitaria. Aunque existen tratamientos profilácticos y terapéuticos para la piroplasmosis equina, los efectos secundarios de estas intervenciones pueden conducir a complicaciones graves como hepatotoxicidad y nefrotoxicidad (Donnellan y Marais, 2009).

Este segundo capítulo se basa en la identificación de factores de riesgo (divididos en factores intrínsecos al animal, como especie, raza, sexo, edad...; condiciones

ambientales y zona, como temperatura, momento del año, en estabulación o en paddocks, número de animales afectados en la explotación...; condiciones asociadas al vector, control de garrapatas...). Además, se ha intentado conseguir información acerca de los síntomas clínicos que se identifican más frecuentemente, los métodos diagnósticos y los tratamientos que usan de forma rutinaria los veterinarios clínicos de équidos de Andalucía. Para conseguir estos datos, hemos enviado cuestionarios a veterinarios de las provincias de Jaén, Córdoba, Sevilla, Málaga, Cádiz y Huelva.

Con todo ello, queremos tener una idea más amplia sobre el manejo de los casos de theileriosis equina en la clínica de campo en Andalucía.

10.2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Este segundo capítulo se basa en las respuestas a un cuestionario enviado a veterinarios de caballos de Andalucía. Los objetivos concretos que se persiguen son los siguientes:

Primero. Establecer cuáles son los factores de riesgo más comunes en caballos con theileriosis en Andalucía. Si bien esto se ha evaluado previamente, hay que tener en cuenta que se han hecho a partir de caballos seropositivos, pero no clínicamente afectados. En nuestro caso, estos factores de riesgo, divididos en grupos (intrínsecos al caballo, de manejo y ambientales y por presencia de vectores), se han analizado en caballos enfermos y que han requerido un tratamiento médico.

Segundo. Evaluar cuales son las alteraciones laboratoriales más comunes en caballos infectados por *Theileria equi* en Andalucía. Estos caballos presentaban sintomatología evidente, lo suficiente como para que el propietario consultara con su veterinario, por lo que, en principio, la infección debería ser de mayor intensidad que la encontrada en los caballos del estudio I.

Tercero. Describir cuales son los procedimientos de diagnóstico y las opciones terapéuticas utilizadas más comúnmente en Andalucía en animales con sintomatología de theileriosis.

Las hipótesis de partida son:

Primera. Que la encuesta revelará que, el mayor número de animales que requirieron tratamiento médico, fueron o jóvenes o geriátricos, en convivencia con otros caballos, en pastoreo o con acceso a paddocks con hierba y durante los meses de primavera y verano.

Segunda. Que el método diagnóstico de predilección de los veterinarios clínicos será la serología, frente al método PCR, posiblemente debido a los diferentes costes económicos.

Tercera. Que los tratamientos más usados por los veterinarios serán el dipropionato de imidocarb y/o la buparvaquona.

10.3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En la presente revisión bibliográfica, se van a describir los resultados de estudios que han evaluado los factores de riesgo para la infección por *Theileria equi* en el caballo, divididos en dos grandes bloques, aquellos factores asociados al animal y los derivados de las condiciones ambientales y prácticas de manejo.

10.3.1. Factores de riesgo intrínsecos al animal

10.3.1.1. Especie animal

Dentro de las especies de équidos, se han observado diferencias significativas en seroprevalencia. En Grecia, se observó una seroprevalencia significativamente mayor de piroplasmosis en mulas en comparación con caballos (Kouam et al., 2010). Según los autores, este hallazgo podría estar asociado al manejo, más que a la especie en sí. Las mulas, permanecían más tiempo al aire libre, al estar ocupadas en actividades agrícolas, principalmente en el transporte diario de madera del bosque. Esta exposición prolongada al bosque, con mucho pasto, probablemente aumentaría la probabilidad de picaduras de garrapatas.

Igualmente, en burros, también se ha observado una seroprevalencia mayor que en caballos (Piantedosi et al., 2014), debido a una exposición más intensa a las garrapatas sin tratamientos de desinfección ni de control. Por tanto, tanto las mulas como los burros, parecen ser mantenidos en unas condiciones de vida al aire libre que les hace ser más susceptibles. En nuestro conocimiento, no se ha estudiado si las mulas y burros mantenidos en las mismas condiciones de manejo que los caballos, siguen mostrando esta mayor seroprevalencia.

10.3.1.2. Raza

Diversas investigaciones han mostrado patrones de seroprevalencia diferentes entre razas. Así, los caballos de raza árabe (Sevinc et al., 2008), los cuarto de milla y las razas locales (Steinman et al., 2012), se identificaron como especialmente susceptibles de contraer piroplasmosis. Probablemente, la mayor prevalencia en estas razas venga dada por las diferencias en las prácticas de manejo, como acceso a pastoreo y proximidad a vacuno.

Otros autores, como Bartolomé del Pino et al. (2016), encontraron diferencias significativas entre las razas italianas y las razas cruzadas, con una posibilidad 3,57 y 2,51 veces superior a presentar seropositividad en comparación con razas importadas. Estas diferencias fueron justificadas por los autores por el tipo de manejo. Muchos de los caballos de raza importada eran caballos de deporte, que suelen permanecer más tiempo en estabulación y menos expuestos a las garrapatas. No obstante, otros autores han postulado que, estas diferencias no se deben solo a las condiciones de manejo, sino que, por el contrario, existen diferencias en sensibilidad entre las diversas razas (Sevinc et al., 2008; Steinman et al., 2012). También se ha sugerido que las razas cruzadas suelen ser más sensibles, mientras que las razas locales de zonas endémicas se encuentran mejor adaptadas a su entorno (Zanet et al., 2017).

En el estudio realizado sobre la diversidad genética del complejo mayor de histocompatibilidad en burros, relacionado con la resistencia a la piroplasmosis equina, los autores defendieron que dicha resistencia se asociaba a los efectos de la cría, así como a los diferentes orígenes genéticos de las poblaciones estudiadas, en lugar de la selección genética conducida por parásitos (Vranova et al., 2011).

10.3.1.3. Sexo

El sexo se ha identificado como un factor de riesgo en numerosos estudios (Shkap et al., 1998; Rüegg et al. 2007; Moretti et al., 2010; Guidi et al., 2015). Se ha indicado que los sementales presentan una menor prevalencia y es menos probable que contraigan la

enfermedad. Esto posiblemente se deba a la circunstancia de que los sementales se mantienen generalmente en estabulación, en vez de permanecer pastando libremente. Por el contrario, dos estudios, uno realizado en Mongolia y el otro en Turquía (Sevinc et al. 2008; Munkhjargal et al. 2013), encontraron significativamente un mayor número de animales seropositivos dentro del grupo de los caballos machos. Posiblemente estos datos sean un reflejo de las diferentes condiciones de cría y estabulación en estos países, así como a las prácticas de manejo específicas de género (Bartolomé del Pino et al., 2016).

En el estudio de Bartolomé del Pino et al. (2016), se analizaron las diferencias en prevalencia entre machos y hembras, siguiendo un modelo multivariable, en el cual las hembras mostraron un coeficiente de probabilidad (OR, 'Odds ratio') de 1,86 para la seroprevalencia de *Theileria equi*. Estos resultados coincidieron con los presentados previamente por Moretti et al., (2010).

En el caso de las hembras, además, se ha detectado como factor de riesgo, el período de lactancia, estresante e inmunosupresor (Piantedosi et al., 2014). Durante la transición de la gestación a la lactancia, el repentino aumento de la demanda de nutrientes para la producción de leche causa alteraciones metabólicas asociadas con supresión inmune y una mayor incidencia de enfermedades infecciosas en animales de granja (Carbonneau et al., 2012). Durante este período, gran parte de la energía del animal se destina hacia la producción láctea, con la consiguiente reducción de energía para el sistema inmune, circunstancia que se traduce en una capacidad de lucha inferior frente a agentes patógenos (Collard et al., 2000).

10.3.1.4. Edad

La edad también ha sido evaluada como un factor de riesgo de seropositividad para los animales. Los animales más longevos presentan un índice de seropositividad superior, resultado que se justifica en base a una exposición más prolongada a las garrapatas vectoriales y a la condición de portadores crónicos en caballos infectados, es decir, la

persistencia de anticuerpos (Karatepe et al., 2009; Kouam et al., 2010; Steinman et al., 2012; García-Bocanegra et al., 2013; Munkhjargal et al., 2013; Vieira et al., 2013; Rapoport et al., 2014).

De este modo, la seroprevalencia de *Theileria equi* aumenta con la edad, encontrándose un coeficiente de probabilidad de 2,59 en los caballos de edad superior a los 12 años (Bartolomé del Pino et al., 2016), resultado que se ha interpretado como un estado de infección crónica, que condiciona una positividad acumulativa. Sin embargo, en esta misma investigación, el coeficiente de probabilidad de la infección, determinada mediante la positividad en la técnica PCR decreció con la edad, al contrario de lo que habían reseñado investigaciones previas llevadas a cabo en Mongolia (Rüegg et al., 2008) e Israel (Steinman et al., 2012). Las circunstancias que determinan la presencia del parásito en sangre (prevalencia en PCR vs. seroprevalencia) a lo largo de la vida del caballo, no se conocen bien. Los datos diferentes en cuanto al coeficiente de probabilidades entre las dos técnicas bien pueden venir dados por la sensibilidad de las mismas o bien por factores varios que influyen la relación hospedador-parásito, que se modifiquen con la edad del caballo.

Según el estudio realizado por Dos Santos et al. (2013), los potros menores de seis meses mostraron una mayor frecuencia de seropositividad frente a *Theileria equi* en comparación con los otros grupos de edad. Esto puede explicarse en parte por la presencia de anticuerpos maternos, que pueden persistir durante 3 a 5 meses (Donnelly et al., 1980; Heuchert et al., 1999). Los animales de 6 a 12 meses presentaron en este estudio un 87,5% (n = 28) de seropositividad frente a *Theileria equi*. La ausencia de anticuerpos maternos en este grupo sugiere que la primera infección por *Theileria equi* tuvo lugar entre 6 y 12 meses o menos, ya que no hay inmunidad pasiva con una duración superior a los 6 meses. A partir de entonces, la frecuencia de seropositividad permaneció estable, sin aumento significativo en animales mayores de 10 años, 85,42% (n = 170). Esto indicaría que, los animales que una vez infectados con *Theileria equi*, siguen siendo portadores durante toda su vida (Friedhoff, 1982; De Waal, 1992), siendo depósitos importantes de este hemoprotozo para las garrapatas vectoriales (Ueti et al., 2008). Una seroprevalencia superior al 75%,

encontrada en animales de 6 a 12 meses de edad, reflejaría una estabilidad enzoótica para *Theileria equi* en las microrregiones estudiadas (Mahoney y Ross, 1972).

10.3.1.5. Estado sanitario y nutricional

La desparasitación se considera un factor protector frente a los parásitos, incluido *Theileria equi* (Zanet et al., 2017). Numerosas investigaciones han reflejado que las vacunaciones y desparasitaciones seriadas, así como el control de insectos en las explotaciones, son prácticas de buen manejo, que pueden reducir la exposición al vector y la aparición de la theileriosis (Dos Santos et al., 2008; Moretti et al., 2010; García-Bocanegra et al., 2013; Vieira et al., 2013; Guidi et al., 2014; Zanet et al., 2017).

Las explotaciones sin programa de vacunación también mostraron una seroprevalencia más elevada frente a theileriosis en caballos en Andalucía, en comparación con aquellas explotaciones que seguían calendarios de vacunación anual (García-Bocanegra et al., 2013). Los programas de vacunación en équidos en España generalmente incluyen la inmunización contra el herpesvirus equino de los serotipos 1 y 4, el virus de la gripe equina y el tétanos, pero no contra piroplasmas equinos. El efecto inmunodepresor de otras enfermedades en animales no vacunados o las deficientes prácticas de manejo en explotaciones sin programas de vacunación, podrían ser el origen de estos resultados (García-Bocanegra et al., 2013). Asimismo, la falta de tratamientos de desparasitación en rumiantes mantenidos en pastoreo, hace más probable la propagación de las garrapatas, aumentando el riesgo de piroplasmosis para los équidos que convivan en estos pastizales (García-Bocanegra et al., 2013; Zanet et al., 2017).

El estado nutricional de cada animal también es un factor de riesgo a tener en cuenta. Un estado nutricional subóptimo ha sido relacionado con una seroprevalencia significativamente superior (Piantedosi et al., 2014). La interacción entre nutrición y función inmune es bien conocida, de modo que un estado nutricional incorrecto podría

conducir a una respuesta inmune insuficiente, aumentando el riesgo de enfermedades infecciosas (Goff, 2006; Ingvarsten y Moyes, 2013).

10.3.2. Factores de riesgo asociados a las condiciones ambientales y prácticas de manejo

10.3.2.1. Características del medio ambiente

El clima y los bióticos de la región mediterránea son especialmente favorables para varias especies de garrapatas, los principales vectores implicados en la transmisión de la piroplasmosis (*Dermacentor*, *Hyalomma* y *Rhipicephalus* spp.). En el estudio realizado por Guidi et al. (2015) sobre la seroprevalencia y distribución de la piroplasmosis en el sur de Francia, se realizó un muestreo de las garrapatas de la zona para investigar la prevalencia de la enfermedad y la diversidad del vector (Chastagner et al., 2013). Estos investigadores buscaron garrapatas en caballos que se encontraban en pastoreo durante las primaveras de 2007-2008 y 2010. Se recogieron un total de 406 garrapatas adultas, pertenecientes a 6 especies diferentes: *Rhipicephalus bursa* (n = 258), *Rhipicephalus sanguineus* (n = 117), *Rhipicephalus turanicus* (n = 4), *Rhipicephalus pusillus* (N = 11), *Dermacentor marginatus* (n = 14), y *Hyalomma marginatum* (n = 2) (Chastagner et al., 2013). Todas estas especies son vectores potenciales para la piroplasmosis equina. En el estudio de Guidi et al. (2015), sin embargo, los caballos seropositivos a cualquiera de los piroplasmas, no siguieron un patrón geográfico. Este resultado fue considerado sorprendente, ya que un estudio previo había mostrado una distribución geográfica en la misma zona de estudio en otras enfermedades transmitidas por garrapatas, como la anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum*) (Leblond et al., 2005). Guidi et al. (2015) justificaron sus resultados en base a la uniformidad ecológica de la zona estudiada, a diferencia de otros estudios, que incluyeron zonas climáticas diferentes (Kouam et al., 2010; Moretti et al., 2010; García-Bocanegra et al., 2013).

Las garrapatas son muy sensibles a las condiciones locales de los nichos ecológicos (Halos et al., 2010), por lo que dependen en gran medida de las condiciones climáticas de la zona, de la altitud y de la presencia de animales de los cuales alimentarse. Los factores climáticos, tales como temperatura, humedad y lluvia, influyen en el hábitat de las garrapatas (Young y Leitch, 1981; Chilton y Bull, 1994). Andalucía se caracteriza por un clima mediterráneo y las regiones occidentales tienen una humedad media y temperaturas medias menos extremas que las observadas en las regiones central y oriental (CMA, 2010). Estas condiciones climáticas características pueden favorecer la supervivencia de las garrapatas en el medio ambiente. La presencia de garrapatas es el único factor de riesgo asociado de manera significativa con *Theileria equi* (García-Bocanegra et al., 2013). Aunque las garrapatas no se recogieron directamente de los équidos en el estudio citado, sí que se pudieron aislar e identificar las principales especies de vectores implicadas en la transmisión de piroplasmosis en Andalucía (*Dermacentor*, *Hyalomma* y *Rhipicephalus* spp.) (García-Bocanegra et al., 2013).

Los niveles de seroprevalencia y de PCR-positividad para la piroplasmosis equina podrían venir determinados por las características abióticas y bióticas y sus interacciones, que afectan a la población de garrapatas y consecuentemente al nivel de exposición a los patógenos. El clima, el microclima, la humedad, la temperatura del suelo y el tamaño de poro, la altitud, la presencia o ausencia de urbanizaciones, la adaptación de las garrapatas a nuevos ambientes y finalmente la presencia del huésped también han sido considerados como factores de riesgo (Pfäffle et al., 2013), en relación con la distribución de garrapatas, la abundancia y el comportamiento. Todos estos factores son esenciales para el mantenimiento constante de vectores y parásitos (Scoles y Ueti, 2015).

La cobertura de la tierra ha sido otro factor de riesgo analizado en la piroplasmosis equina. Se ha observado una seropositividad más elevada en animales que habitan en zonas mixtas, es decir, sin un predominio de una categoría particular de cobertura del suelo, así como en áreas con más de un 75 % de cobertura forestal (Dos Santos et al., 2011). En un modelo multivariado para la seropositividad de *Theileria equi*, la cobertura del suelo fue nuevamente una variable significativa, con un coeficiente de probabilidad del 0,42 en

terrenos con un 50-75% en comparación con la categoría de terreno con más de un 75% de bosque (Piantedosi et al., 2014). Estos resultados coinciden con los presentados por Vanwambeke et al. (2010), quienes sugirieron que los campos arables o zonas de bosques rodeados de tierras agrícolas tienen un impacto favorable en el control de enfermedades transmitidas por vectores, en contraposición a aquellos terrenos con un alto porcentaje de tierras forestales, probablemente debido a un ambiente menos adecuado para la presencia de garrapatas en el primer tipo de cobertura de tierra, relacionado con su uso agrícola.

La asociación de la altitud con la seropositividad a *Theileria equi* muestra que altitudes crecientes podrían reducir la probabilidad de infección de caballo (Dos Santos et al., 2011). Esto puede explicarse por la interferencia climática en el ciclo del vector de garrapatas en altas altitudes. En estas zonas, las características del clima suelen ser más duras y por lo tanto, es más difícil la supervivencia de las garrapatas (Davitkov et al., 2016).

En un área endémica para la theileriosis equina y de estabilidad enzoótica para *Theileria equi*, los caballos importados desde otras regiones e incluso de países no endémicos, sin infección previa, pueden sufrir un proceso agudo, mientras que el resto de équidos de la explotación pueden carecer de sintomatología, debido al contacto repetido con el vector y al estado de portadores asintomáticos adquirido (García-Bocanegra et al., 2013).

10.3.2.2. Instalaciones y explotaciones

El pastoreo ha sido considerado como factor de riesgo importante en diversos estudios, sin encontrar una predisposición racial (Moretti et al. 2010; Steinman et al. 2012; Rapoport et al., 2014; Ribeiro et al., 2016). Según esos estudios, los caballos en pastoreo o en zonas pantanosas durante el día mostraban un coeficiente de riesgo 2,1 y 4,5 superior a ser seropositivo para *Babesia caballi* y *Theileria equi*, respectivamente.

Los animales mantenidos en instalaciones al aire libre tienen una probabilidad más elevada de encontrarse expuestos a las garrapatas, aumentando el riesgo de infección. El

pastoreo y el uso de los caballos para el trabajo agrícola, aumenta las posibilidades de contacto directo con los vectores, por lo que numerosas investigaciones han destacado su importancia como factores de riesgo (Kouam et al., 2010; Moretti et al., 2010; Abutarbush et al., 2012; Rapoport et al., 2014; Ribeiro et al., 2016).

También se ha descrito que trabajar o convivir con vacas está asociado con un resultado serológico positivo, como se describió en Brasil (Heuchert et al., 1999). Esto se debe al hecho de que las garrapatas tienen capacidades limitadas de dispersión y su presencia depende de la abundancia de los huéspedes apropiados. Otros estudios también han revelado que, la población de garrapatas *Ixodes* era superior en zonas de pastizales, donde también se encontraban vacas en pastoreo (Léger et al., 2013).

En un estudio realizado en Grecia se observó que la presencia de perros con garrapatas dentro del paddock aumentaba el nivel de seroprevalencia, debido a que se favorecía la presencia del vector, parte fundamental de la transmisión de la enfermedad (Kouam et al., 2010). En este estudio, además, se observó que el frecuente movimiento de caballos entre centros deportivos e hipódromos de diferentes regiones de Grecia favorecía un nivel de seroprevalencia superior.

10.4. MATERIAL Y MÉTODOS

10.4.1. Diseño del cuestionario

El estudio se realizó utilizando un diseño basado en cuestionarios, que fueron enviados a veterinarios dedicados a la clínica equina de las provincias de Córdoba, Sevilla, Huelva, Cádiz y Jaén; mediante correo electrónico, de tal manera que ellos solo tenían que rellenar los cuestionarios y volver a reenviarlos por correo electrónico. Primero se contactó con cada uno de ellos telefónicamente para solicitar su colaboración con la recogida de información, y una vez conformes, se les envió el cuestionario.

El problema que hemos tenido es que no todos los compañeros a los que se les ha enviado el cuestionario han llegado a rellenarlo y reenviárnoslo. Los veterinarios dedicados a la clínica equina, trabajan la mayor parte del día en el campo y cuando vuelven a casa, les resulta complicado revisar sus casos clínicos de piroplasmosis. Además, un gran número de ellos no lleva un registro de pacientes ni anotan los resultados de sus exploraciones. Por tanto, ha habido una colaboración mucho menos intensa de lo esperado y si bien, en un principio, estos clínicos aceptaron la participación en el estudio, con posterioridad no reenviaron los cuestionarios rellenos.

Los cuestionarios eran individuales para cada caballo, de tal manera que cada veterinario tenía que rellenar un cuestionario por cada caso clínico de theileriosis. El cuestionario se dividió en cuatro secciones: (1) características del caballo, manejo y condiciones medioambientales, (2) caracterización clínica, (3) métodos de confirmación diagnóstica y (4) procedimiento terapéutico. Las variables recogidas se enumeran en la Tabla 27. Se indicó que rellenaran estos cuestionarios para los pacientes que habían tenido (y de los que había registro de sintomatología, diagnóstico y tratamiento) en los últimos 3 años (de 2014 a 2017).

Tabla 27. Información solicitada en el cuestionario en cada una de las secciones

Sección	Variable específica preguntada
Sección 1. Características del caballo, manejo y condiciones medio-ambientales	Raza del caballo
	Edad del caballo
	Sexo del caballo
	Uso del caballo
	Manejo del animal
	Localización geográfica
	Caballo importado
	Características ambientales
Control de garrapatas	
Sección 2. Caracterización clínica	Fecha inicio de los síntomas
	Caballos afectados de la explotación
	Motivo de la consulta
	Exploración física
Sección 3. Métodos de confirmación diagnóstica	Hematología
	PCR
	Bioquímica
	Serología
Sección 4. Procedimiento terapéutico	Hallazgos importantes que recuerdes
	Tratamiento utilizado
	Duración del tratamiento
	Evolución del caso

10.4.2. Análisis estadístico

Se trata de un análisis descriptivo, por lo que los datos se presentan, tanto como porcentajes del número total de cuestionarios respondidos de forma completa como en número absoluto.

10.5. RESULTADOS

De los 55 cuestionarios enviados, se han recibido completados de forma casi completa 37.

10.5.1. Datos relativos a los animales infectados

Solo se han recibido cuestionarios relativos a caballos, sin referencia a otros tipos de équidos, como burros o mulos. La distribución por razas se presenta en la figura 1. Como se puede apreciar en esta figura, la mayor parte de los caballos fueron PRE (40,54%), seguidos por cruzados (29,73%), Hispanoárabes Ha y Angloárabes Aa, 13,51%, ambos y finalmente, un caballo de deporte español CDE, 2,70%.

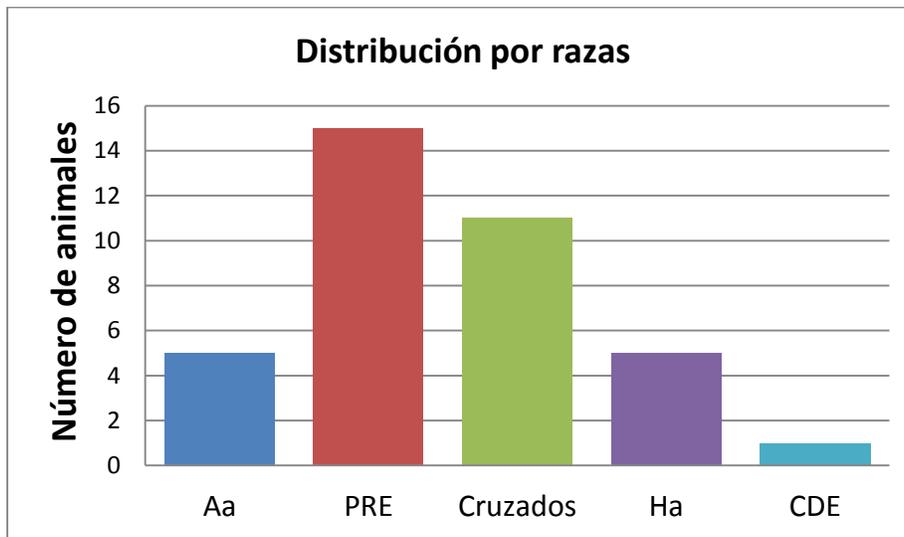


Figura 1. Distribución por razas de los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)

La distribución por sexos se muestra en la figura 2. Como se puede observar, el número superior correspondió a los machos enteros (n=16; 43,24%), seguidos por las hembras (n=14; 37,84%) y finalmente por machos castrados (n=7; 18,92%).

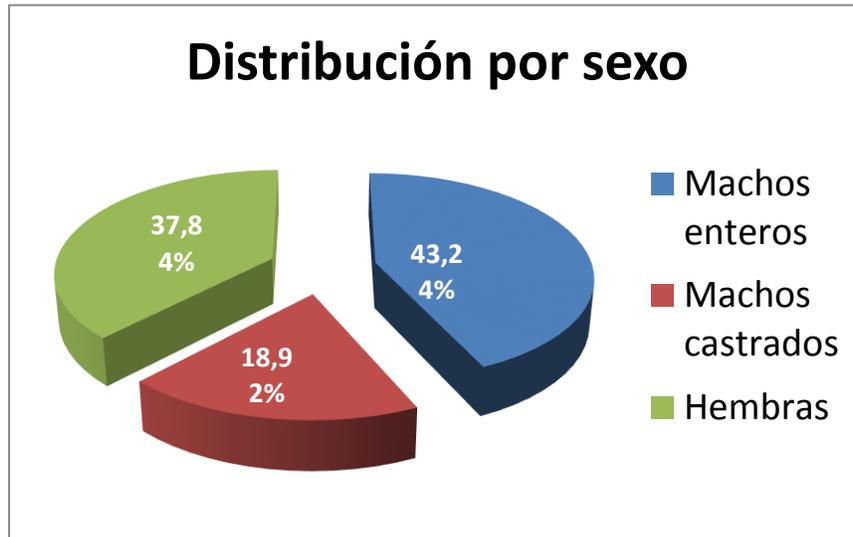


Figura 2. Distribución por sexo de los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)

En relación a la edad, se han diferenciado 4 grupos de edad: <6 años, entre 6 y 10 años, entre 11 y 15 años y más de 15 años. La distribución por edades se muestra en la figura 3. El porcentaje superior de animales correspondió al grupo con edades comprendidas entre 6 y 10 años (59,46%), seguido por los animales menores de 6 años (16,22%) y entre 11 y 15 años (16,22%) (Figura 3).

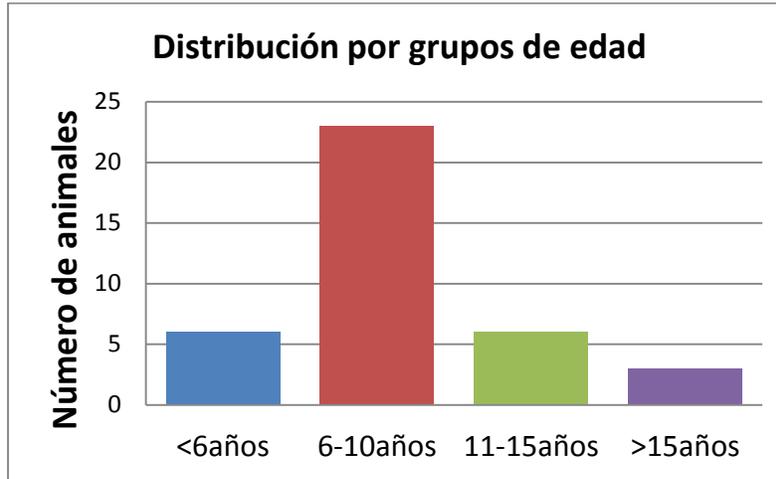


Figura 3. Distribución por grupos de edad de los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)

Ninguno de los animales era importado. Su uso se presenta en la figura 4. La mayoría eran caballos de paseo (n=17; 45,95%), seguido de deporte (n=12; 32,43%) y reproducción (n=8; 21,62%).

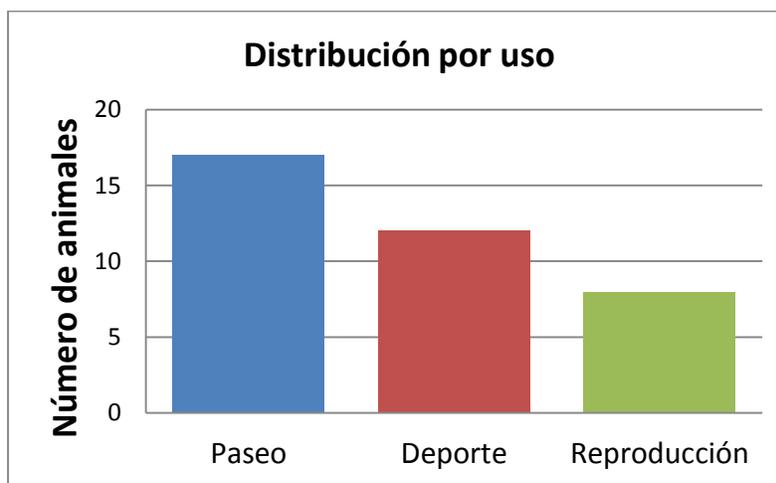


Figura 4. Distribución por uso de los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)

10.5.2. Datos de manejo y ambientales

En la figura 5 se muestra la distribución por provincias. La mayor parte de los animales provinieron de las provincias de Sevilla (n=15; 40,54%) y Córdoba (n=11; 29,73%).

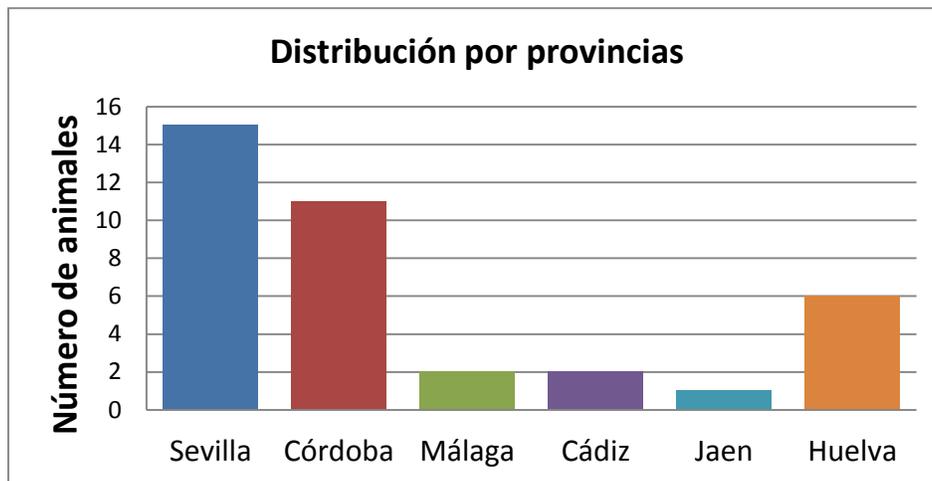


Figura 5. Distribución por provincias de los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)

Los meses en los que se diagnosticó la theileriosis más comúnmente fueron: junio (n=9; 24,32%), mayo (n=7; 18,92%) y julio (n=6; 16,22%). En general, todos los diagnósticos se llevaron a cabo dentro de los meses marzo a octubre. Ningún diagnóstico se efectuó entre noviembre y febrero, como se muestra en la figura 6.

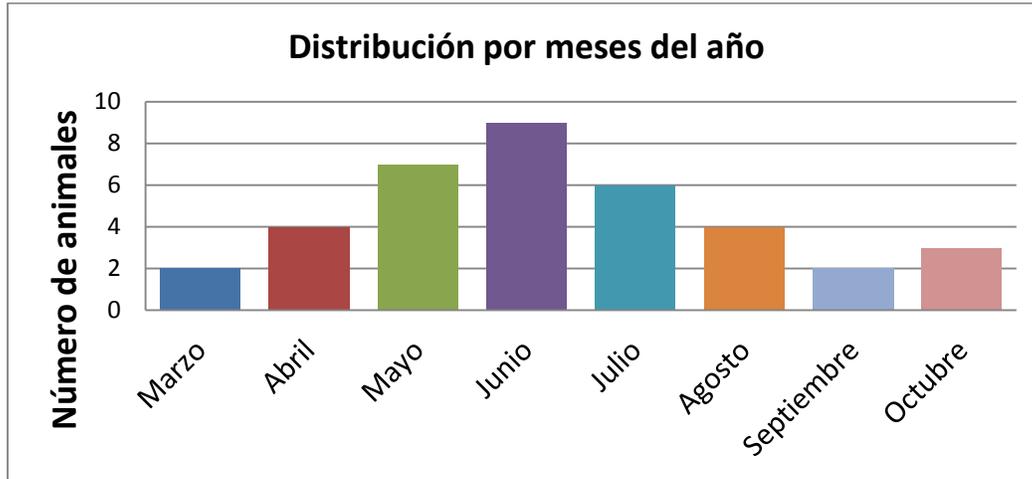


Figura 6. Distribución por meses en los que se realizó el diagnóstico de los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)

En las figuras 7 y 8 se muestran las condiciones ambientales (temperatura ambiental y humedad relativa) en los meses en los que se realizaron los diagnósticos de theileriosis. Como valores medios de todos los meses (marzo a octubre), tenemos los siguientes: temperatura ambiental, $33,51 \pm 4,919$ °C (valores máximo y mínimo, 40,00 y 20,00 °C) y humedad relativa, $24,19 \pm 18,58\%$ (valores máximo y mínimo, 85 y 10%).

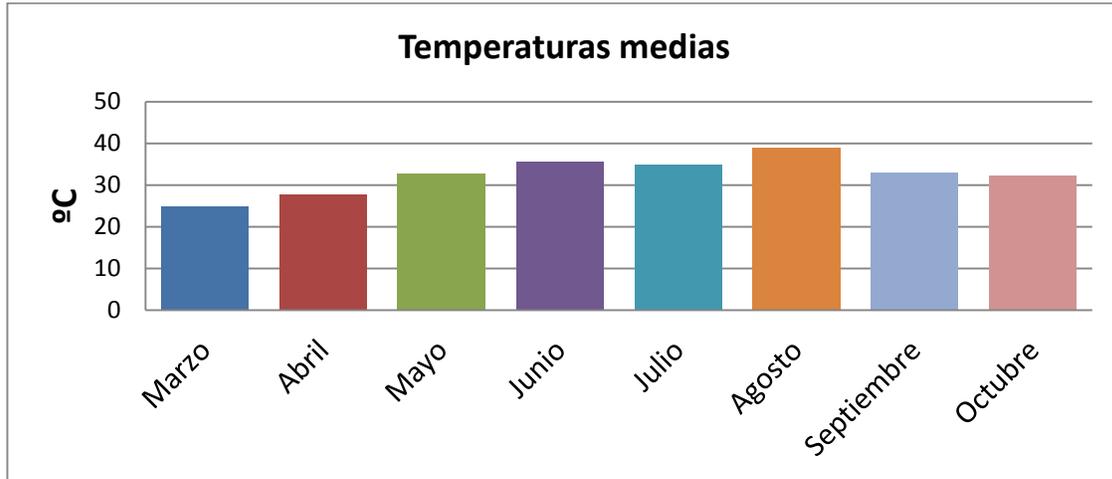


Figura 7. Temperaturas medias durante los meses en los que se realizó el diagnóstico de los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)

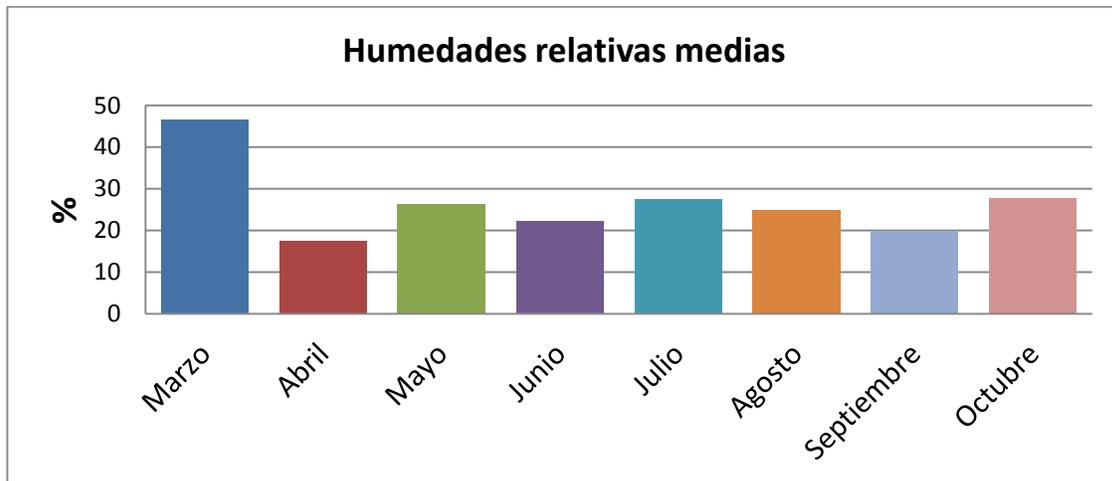


Figura 8. Humedades relativas medias durante los meses en los que se realizó el diagnóstico de los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)

La mayoría de los casos fueron pacientes aislados (n=35; 94,60%). Solamente en dos casos (5,40%) estuvieron afectados más de 1 caballo del mismo lugar.

En la figura 9, se muestran los caballos que estaban estabulados (n=23; 62,16%) frente a los que estaban en paddocks o bien tenían acceso frecuente a pastoreo (n=14; 37,84%).

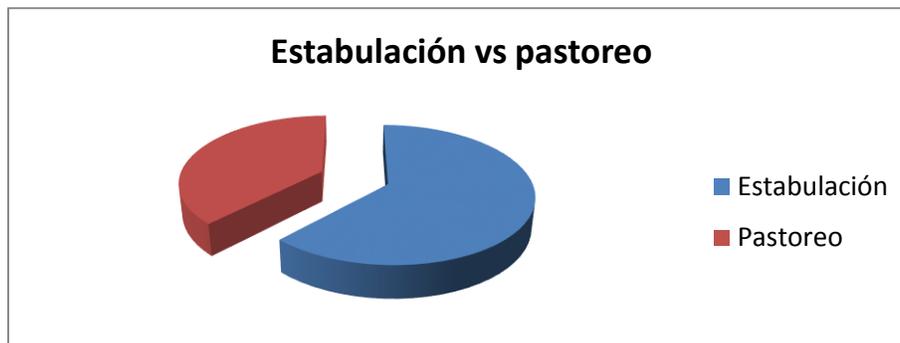


Figura 9. Manejo de los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)

En cuanto al control de garrapatas realizado en las explotaciones, en un 54% de las explotaciones se realizaba control de garrapatas mediante la aplicación de compuestos fenólicos¹⁹ en las cuadras y la pulverización de cipermetrina²⁰ sobre los animales que estaban en pastoreo.

10.5.3. Características clínicas de los animales infectados

En la figura 10, se muestran los motivos iniciales de la consulta. Como se puede apreciar, las causas más comunes de consulta fueron los síntomas digestivos (cólico; n=15; 40,54%), seguidos de apatía y depresión (n=11; 29,73%). Otros síntomas menos comunes

¹⁹ Zotal ®

²⁰ Barricade ®, Zoetis AR

fueron respiratorios (13,51%) y menos frecuentes, neurológicos (5,405%) y dificultad para poner/mantener peso (según propietario, ‘no engorda’) (5,402%) (Figura 10).

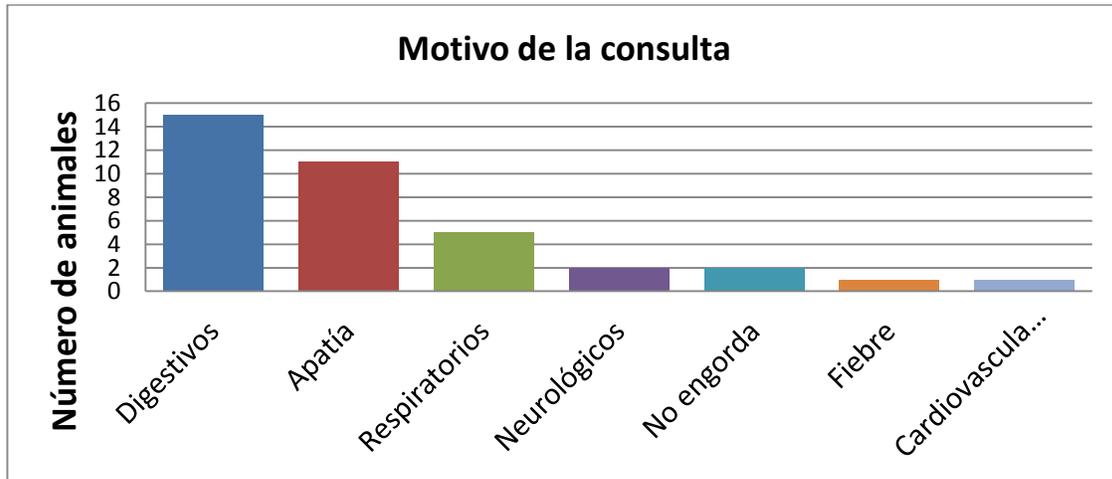


Figura 10. Motivo de la consulta en los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)

A continuación, se presentan los síntomas encontrados en el examen clínico de los caballos infectados por *Theileria equi*, según indicaron los cuestionarios (Tabla 28).

TABLA 28. Frecuencia de aparición de los síntomas en caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)

Síntomas clínicos	Número de animales afectados	Porcentaje de animales afectados
Inapetencia	34/37	91,89%
Pérdida rendimiento-cansancio	34/37	91,89%
Fiebre	32/37	86,49%
Depresión	31/37	83,78%
Mucosas pálidas	31/37	83,78%
Ictericia	30/37	81,08%
Edemas	11/37	29,73%
Petequias	9/37	24,32%
Hemoglobinuria	7/37	18,97%

La localización de los edemas fue la siguiente: prepucio (45,46%), extremidades (27,27%), prepucio y extremidades (18,18%) y parte ventral del abdomen (9,09%).

10.5.4. Procedimientos diagnósticos

En la figuras 11 y 12 se muestran los animales en los que, como parte del procedimiento diagnóstico, se llevó a cabo un examen hematológico y bioquímico sanguíneo (en el 78,38% y 37,84% de los animales, se realizaron una hematología y una bioquímica sanguínea básica, respectivamente).

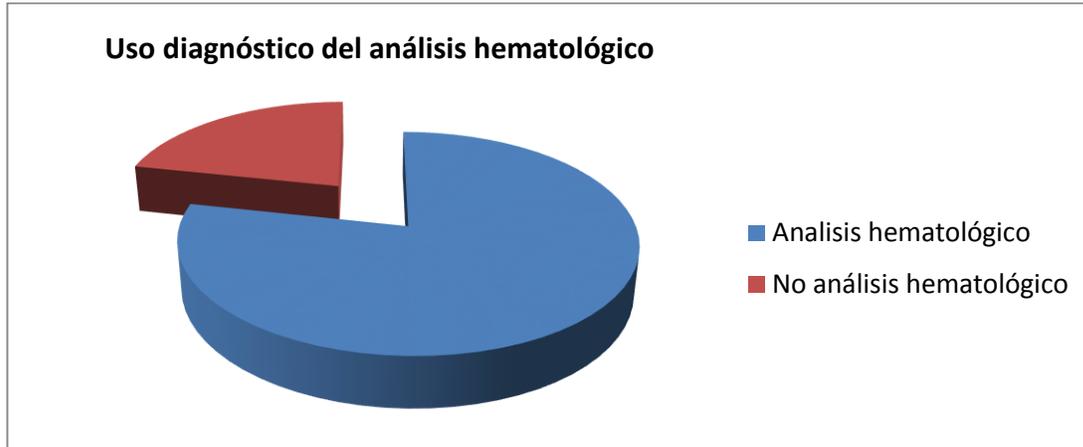


Figura 11. Uso de la hematología como método de diagnóstico complementario en caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)

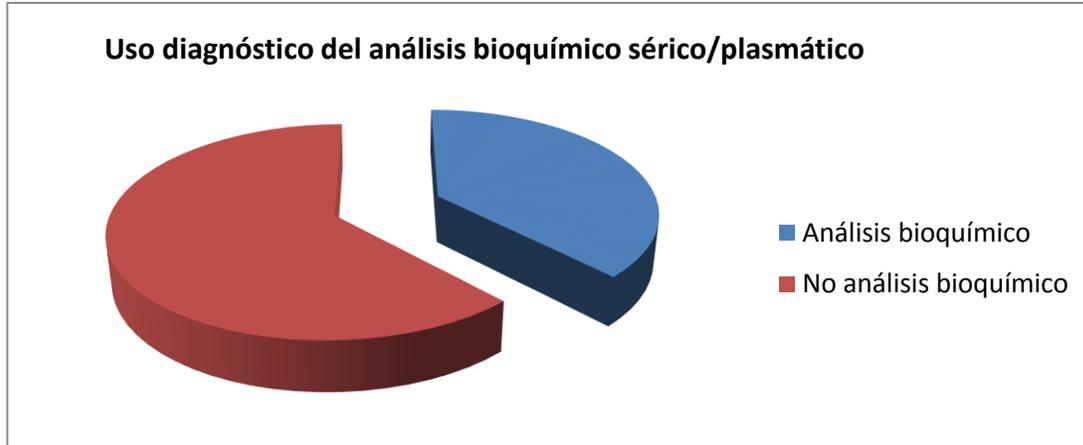


Figura 12. Uso de la bioquímica plasmática/sérica como método de diagnóstico complementario en caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)

Con respecto a los métodos utilizados para el diagnóstico fueron, por orden de frecuencia: prueba de reacción de la polimerasa, PCR (51,52%), técnica de

inmunofluorescencia indirecta, IFI (27,27%), análisis inmunoenzimático, ELISA (18,19%) e identificación del parásito en frotis sanguíneo (3,03%) (Figura 13).

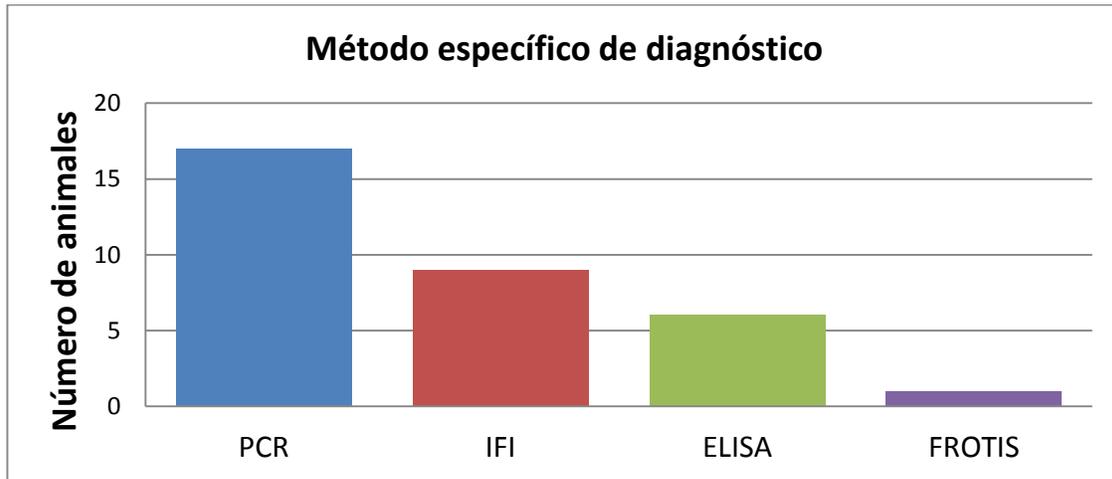


Figura 13. Método específico de diagnóstico en los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)

10.5.5. Procedimiento terapéutico seguido en los animales infectados

En la figura 14 se muestra la quimioterapia utilizada para tratar la theileriosis. Un 54,05% de los animales recibieron imidocarb, 40,54% buparvaquona, 2,71% oxitetraciclina y 2,71% una combinación de imidocarb con oxitetraciclina y sulfatrimetoprim (Figura 14).

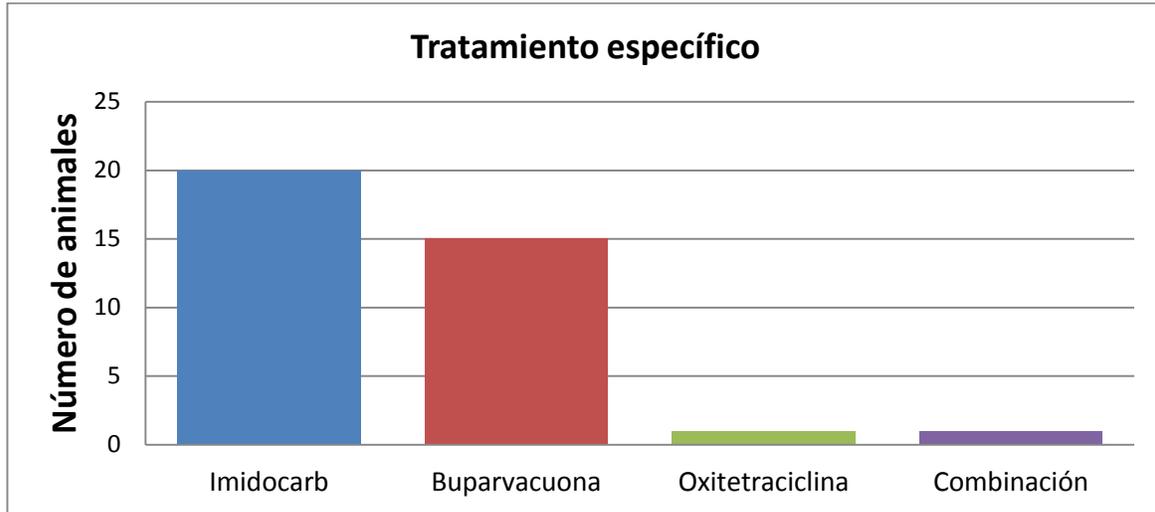


Figura 14. Quimioterapia específica en los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)

Un total de 36 animales (97,30%) recibieron un tratamiento de soporte. El tratamiento de soporte se muestra en la tabla 29.

TABLA 29. Tratamiento de soporte en caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)

Tratamiento de soporte	Número de animales	Porcentaje
Suplementos vitamínicos varios	26/36	72,22%
Red cell ²¹	14/36	38,88%
Duphalyte ²²	11/36	30,60%
Antiinflamatorios no esteroideos	6/36	16,67%
Transfusión sanguínea	2/36	5,57%
Hierro	1/36	2,78%
Fluidoterapia	1/36	2,78%

²¹Red cell, VetNova®. Composición: Zinc, cobalto, cobre, colina, dimetilglicina, glicina, hierro, inositol, l-carnitina, manganeso, vitaminas A, B1, B2, B5, B6, C, D3 y E

²²Duphalyte, Zoetis ES®. Composición: Vitaminas grupo B, electrolitos, aminoácidos y dextrosa

La duración total del proceso hasta la recuperación completa se presenta en la figura 15.

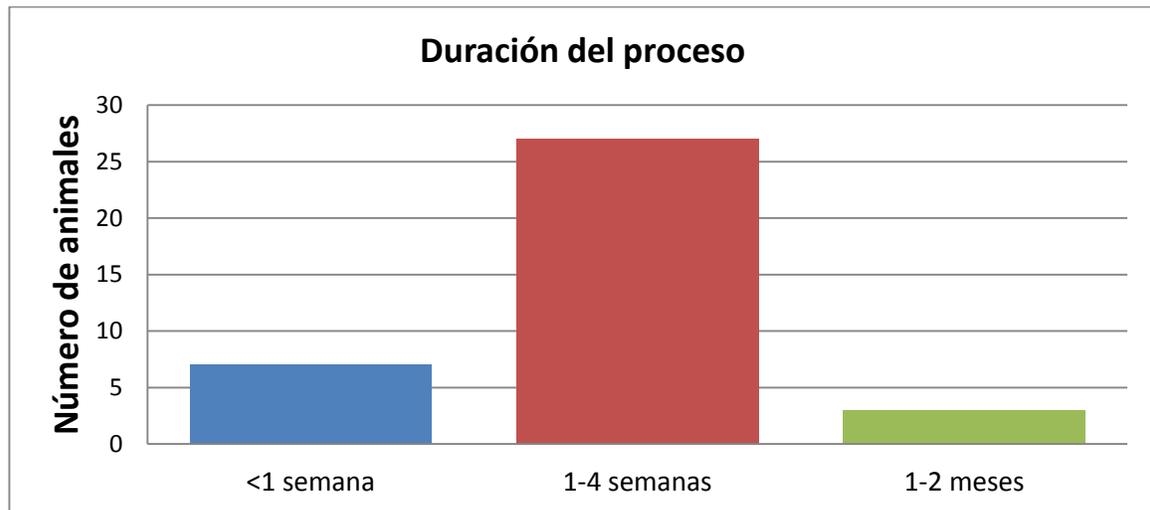


Figura 15. Duración del proceso en los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)

Finalmente, el pronóstico del proceso se muestra en la figura 16. Un 94,60% de los animales tuvo una evolución favorable, un 2,70% experimentó recivida y un 2,70%, mostró una evolución mala que concluyó con el fallecimiento del paciente.

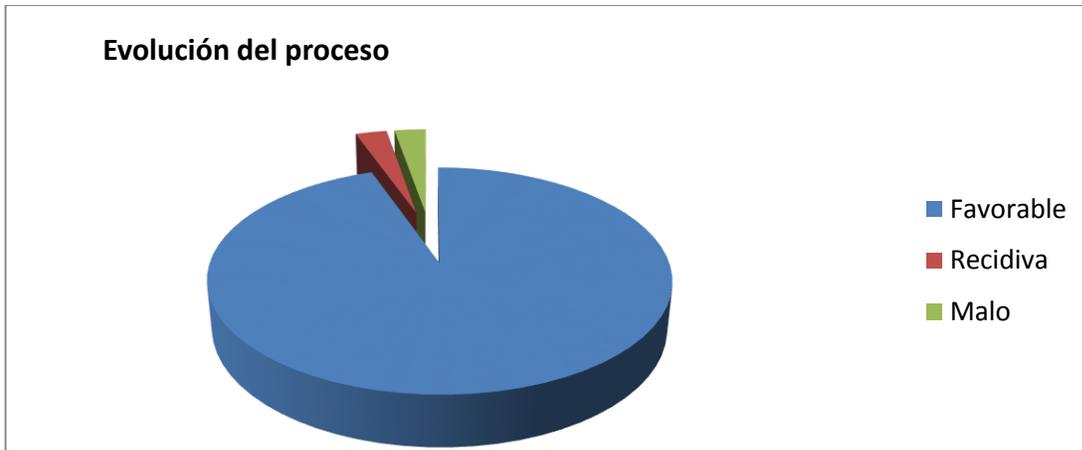


Figura 16. Evolución del proceso en los caballos infectados por *Theileria equi* (datos obtenidos mediante cuestionarios a veterinarios de équidos de Andalucía)

10.6. DISCUSIÓN

En este segundo capítulo se realiza un estudio descriptivo, en el cual se evalúan los diversos factores de riesgo de la infección clínica por *Theileria equi* en caballos en Andalucía. Estos factores de riesgo se han dividido en factores intrínsecos al animal, como especie, raza, sexo, edad; condiciones ambientales y zona, como temperatura, momento del año, en estabulación o en paddocks, más animales afectados en la explotación; condiciones asociadas al vector, control de garrapata. También, se ha intentado conseguir información acerca de los síntomas clínicos que se identifican más frecuentemente en Andalucía, diferenciando entre el motivo de la llamada del propietario y los síntomas que encuentran los clínicos al evaluar al animal, los métodos diagnósticos y los tratamientos que usan de forma rutinaria estos clínicos de équidos de nuestra comunidad autónoma. Con todo ello, hemos intentado proporcionar datos sobre el manejo de los casos de theileriosis equina en la clínica de campo en Andalucía.

10.6.1. Datos relativos a los animales infectados

En relación a la raza de los caballos, el porcentaje superior correspondió a caballos PRE. Este dato posiblemente sea un reflejo de la frecuencia de cada raza en Andalucía. Según el censo de la Asociación Nacional de Criadores de Caballos Españoles (ANCCE), el 42% del censo nacional de caballos PRE se encuentra en Andalucía, es decir, de los 186.095 caballos censados en esta Comunidad Autónoma, 75.731 son PRE, representando un 40,69% de la población equina andaluza. Es decir, en Andalucía el 40,69% de los caballos censados son PRE, por lo que los datos obtenidos a través de las encuestas se encuentran acorde con los datos de las razas de caballos censadas en Andalucía. Por tanto, no se puede asegurar que esta raza presente una mayor sensibilidad, sino que al ser una raza mayoritaria en Andalucía, el porcentaje de infección sería un reflejo directo de la población equina PRE.

El número de machos infectados (43,24%) fue superior al de las hembras (37,84%). Diversos autores han descrito que el sexo no parece ser un factor de riesgo para las infecciones por *Theileria equi* en caballos (Kouam et al., 2010; Grandi et al., 2011; Farkas et al., 2013; García-Bocanegra et al., 2013). No obstante, muchos autores indican una seroprevalencia superior en yeguas (Sevinc et al., 2008; Kouam et al., 2010). Nosotros pensamos que el hecho de que el número de machos infectados haya sido mayor que el de las hembras, puede ser debido a que los machos se encuentran en estabulación y no tienen un contacto repetido con el vector que les haga presentar un estado de portadores asintomáticos. De este modo, cuando salen de las cuadras para trabajar o dar paseos pueden infectarse al entrar en contacto con las garrapatas, y como no tienen desarrollada una inmunidad, esto desencadenaría la enfermedad. Otro factor a considerar es que, los machos, si son reproductores, posiblemente estén más vigilados por parte del propietario que las hembras. Sin embargo, como luego se comentará, el uso primario de estos caballos era el paseo, seguido de la actividad deportiva, por lo que no creemos que esta última hipótesis haya tenido demasiada relevancia en nuestros resultados.

En cuanto a la edad, los animales que presentaron, según las encuestas, mayor incidencia de sintomatología clínica fueron aquellos situados en un rango de edad comprendido entre los 6 y los 10 años. Diversos estudios han observado que los animales de mayor edad presentaban un índice de seropositividad superior (Karatepe et al., 2009; Kouam et al., 2010; Steinman et al., 2012; García-Bocanegra et al., 2013; Munkhjargal et al., 2013; Vieira et al., 2013; Rapoport et al., 2014). Por el contrario, algunas investigaciones no han hallado correlaciones significativas entre seropositividad y edad de los animales (Grandi et al., 2011; Farkas et al., 2013; García-Bocanegra et al., 2013), resultados éstos últimos que parecen más acordes con los nuestros. Ninguno de estos autores evaluó la seroprevalencia en los diversos grupos de edad en función de datos demográficos. No disponemos de información sobre la distribución de edad de la cabaña equina andaluza, por lo que no se puede afirmar si, los caballos entre 6-10 años tuvieron verdaderamente una mayor incidencia de infección o fue un reflejo de un número superior de animales dentro de este grupo. No obstante, también hay que tener en cuenta que esta

edad representa un grupo de caballos adultos, maduros, con numerosas prestaciones, por lo que su uso para paseos y para deporte es elevado en este momento de su vida.

Dentro del uso del caballo, el porcentaje superior de animales con clínica de theileriosis correspondió a paseo (45,95%), seguido de uso deportivo (32,43%) y reproducción (21,62%). Creemos que estos resultados pueden asociarse al hecho de que, al salir al campo, los caballos tienen más riesgo de entrar en contacto con las garrapatas, principalmente en la época primaveral que es cuando la temperatura ambiental es más agradable para los paseos y cuando la población de garrapatas posiblemente sea mayor.

10.6.2. Datos de manejo y ambientales

Las provincias de las que hemos recogido un porcentaje superior de casos fueron Sevilla y Córdoba. Estos resultados, sin duda, vienen muy condicionados por la colaboración de los veterinarios de estas provincias. Sin embargo, se asume que es la provincia de Huelva seguida de la de la zona norte de la provincia de Sevilla las que muestran un número superior de casos, según la experiencia clínica de los veterinarios. Desgraciadamente, pocos veterinarios de Huelva han rellenado los cuestionarios, si bien las comunicaciones telefónicas con veterinarios que ejercen su clínica en diversas provincias destacan con frecuencia estas dos zonas como las de mayor incidencia clínica de piroplasmosis. Pensamos que esto se puede explicar por las condiciones ambientales de estas dos zonas, de climatología no tan dura como la zona del Guadalquivir ni tan suaves como zonas costeras. Los factores climáticos, tales como temperatura, humedad y la lluvia, son condicionantes esenciales en el hábitat de las garrapatas (Young y Leitch, 1981; Chilton y Bull, 1994).

Todos los diagnósticos clínicos se llevaron a cabo dentro de los meses de marzo a octubre, coincidiendo con las épocas en las que hay una mayor presencia de garrapatas. El clima y los biótupos de la región mediterránea son especialmente favorables para varias especies de garrapatas, los principales vectores implicados en la transmisión de la

piroplasmosis (*Dermacentor*, *Hyalomma* y *Rhipicephalus* spp.). Las garrapatas son muy sensibles a las condiciones locales de los nichos ecológicos (Halos et al., 2010), por lo que dependen en gran medida de las condiciones climáticas de la zona, de la altitud y de la presencia de animales de los cuales alimentarse. En estos meses, la temperatura ambiental media fue de $33,51 \pm 4,919$ °C y la humedad relativa es de $24,19 \pm 18,58$ %. Estas condiciones climáticas podrían favorecer la supervivencia de las garrapatas en el medio ambiente. La presencia de garrapatas fue el único factor de riesgo asociado de manera significativa con *Theileria equi* en el estudio realizado por García-Bocanegra et al. (2013) en Andalucía.

La mayor parte de los animales sintomatológicos permanecían en estabulación (n=23) frente a los que estaban en paddock o en pastoreo (n=14). Lo que cabría esperar, era que los animales en pastoreo tuvieran una incidencia clínica mayor al estar en contacto con las garrapatas de manera más estrecha, y de hecho, numerosos estudios han destacado su importancia como factor de riesgo (Kouam et al., 2010; Moretti et al., 2010; Abutarbush et al., 2012; Rapoport et al., 2014; Ribeiro et al., 2016). No obstante, estas condiciones de manejo también facilitan la aparición de portadores asintomáticos. Los caballos estabulados al no estar en contacto continuo con el vector, cuando salen a dar paseos o a entrenar si tienen uso deportivo, pueden tener riesgo de picaduras de garrapatas que provoquen la infección.

Aunque en el 54% de las explotaciones de los caballos infectados se realizaba control de garrapatas, probablemente no resultó efectivo. Quizás no se realizó de manera adecuada, es decir no se pulverizó a los animales antes de la salida al campo para los paseos, sino que se pulverizó a algunos animales cuando observaron garrapatas para que se desprendieran del animal, con lo cual el animal ya habría sufrido una picadura de garrapata.

10.6.3. Características clínicas de los animales infectados

Las características clínicas descritas en los cuestionarios pueden quedar englobadas dentro de las establecidas como forma aguda de la enfermedad. Parece ser el curso más común y se manifiesta con síntomas no específicos, tales como fiebre, que puede superar los 40°C, disminución del apetito, pérdida de peso y edemas periféricos (Zobba et al., 2008; Rothschild, 2013; Tamzali, 2013; Wise et al., 2013; 2014).

Las causas más comunes de consulta, es decir, el motivo de llamada del propietario, según los cuestionarios, fueron los síntomas digestivos (cólico; n=15; 40,54%), seguidos de apatía y depresión (n=11; 29,73%). Previamente, se han descrito que algunos caballos pueden presentar síntomas de complicaciones gastrointestinales, incluyendo cólico o impactaciones seguidas de diarrea (Wise et al., 2013).

Sin embargo, cuando el clínico hizo la exploración del animal, los síntomas más evidentes fueron, por orden de frecuencia, inapetencia (91,89%), pérdida de rendimiento (91,89%), fiebre (86,49%), mucosas pálidas (83,78%) e ictericia (81,08%). Varias investigaciones, coinciden en describir encontrar síntomas asociados a anemia hemolítica, tales como mucosas pálidas o ictéricas, taquicardia, taquipnea, debilidad y pigmenturia, debido a hemoglobinuria o bilirrubinuria (Ambawat et al., 1999; Camacho et al., 2005; Zobba et al., 2008; Tasaki et al., 2013; Rothschild, 2013; Wise et al., 2013; 2014), e igualmente coinciden con los síntomas que nosotros hemos descrito en caballos PRE en el primer capítulo de esta tesis. La fiebre se considera un signo clínico común de piroplasmosis equina (Camacho et al., 2005; Zobba et al., 2008; Wise et al., 2013; 2014). Otras manifestaciones clínicas menos frecuentes incluyen el desarrollo secundario de neumonía, edema pulmonar, arritmias cardíacas, enteritis catarral, laminitis y afectación del sistema nervioso central, con ataxia, mialgia y convulsiones (De Waal y Van Heerden, 2004; Diana et al., 2007; Zobba et al., 2008; Rothschild, 2013; Wise et al., 2013; 2014).

Estos datos clínicos llevan a pensar que, solo la forma aguda de la enfermedad es la que realmente lleva al propietario a llamar al veterinario para aplicar un tratamiento médico. Por el contrario, los casos subagudos o crónicos, la gran mayoría de las veces

pasan desapercibidos, al presentar los animales un estado de portador asintomático, que sólo cuando hay un compromiso inmunológico puede provocar sintomatología aparente.

10.6.4. Procedimientos diagnósticos en los animales infectados

Como método de diagnóstico complementario en caballos infectados por *Theileria equi*, se realizó en un 78,38% de los casos el examen hematológico, mientras que el uso de la bioquímica plasmática/sérica como método de diagnóstico complementario sólo se utilizó en un 37,85% de los casos. En nuestra opinión, estos datos se relacionan con el coste económico de las pruebas. La crisis económica experimentada por el sector equino en estos últimos años, así como las limitaciones económicas de los propietarios, hace que éstos deban de reducir los gastos de sus animales y más aún, en caso de explotaciones. Esta consecuencia económica, afecta al trabajo de los veterinarios clínicos, los cuales se ven perjudicados y no siempre se les permite hacer las pruebas necesarias para poder hacer un buen diagnóstico. Todos los veterinarios nos han comentado el problema del coste económico de las pruebas hematológicas, bioquímicas así como de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y métodos serológicos, como ELISA de competición (cELISA) o inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Tanto la hematología como la bioquímica sérica/plasmática son importantes para evaluar el grado de infección de los animales y la posible afectación de los diversos sistemas orgánicos, para poder diseñar de forma correcta una opción terapéutica.

La prueba más utilizada para la detección del parásito, según los datos de los cuestionarios fue la PCR. Las pruebas PCR para la detección del organismo de interés se basan en la amplificación y detección de fracciones específicas del ADN. Esta prueba es muy sensible y hasta ahora se han utilizado tres variantes de PCR para la detección de *Theileria equi*: PCR en tiempo real (Kim et al., 2008; Bhoora et al., 2010; Alanazi et al., 2014; Laus et al., 2015; Bartolomé del Pino et al., 2016), PCR anidada y PCR anidada con hibridación (Butler et al., 2008; Ferreira et al., 2016; Sumbria et al., 2016; Ayala-Valdovinos et al., 2017). En todos los casos la variante utilizada ha sido la PCR a tiempo

real. Esta técnica se basa en la detección del parásito en sangre por lo que es muy eficaz para los casos agudos. Sin embargo, la aplicación de estos métodos moleculares para la detección de casos crónicos y portadores, no es demasiado eficaz, ni tampoco fiable, al estar basados en la detección del parásito en sangre (Jaffer et al., 2010).

10.6.5. Procedimiento terapéutico en los animales infectados

Las infecciones por *Theileria equi* son más difíciles de tratar que las infecciones por *Babesia caballi* (Frerichs et al., 1973; Frerichs y Holbrook, 1974). Existen muchas combinaciones para el tratamiento y eliminación del parásito. Ninguna ha demostrado una eficiencia 100% en cuanto a la eliminación del parásito, aunque sí contra la eliminación de formas intraeritrocitarias, culminando la fase clínica. Los fármacos más eficaces son la buparvaquona y la parvaquona, si bien su uso no está permitido en nuestro país, aunque se pueden conseguir a través de la Agencia del medicamento. El procedimiento consiste en realizar un escrito con las características del caballo y del caso clínico y la Agencia realiza un envío de buparvaquona. Esto no es conocido por todos los veterinarios, por lo que utilizan como alternativa la administración de compuestos babesicidas, como el dipropionato de imidocarb, con una utilidad dudosa, limitada y variable según los autores (Kumar et al., 2003; Vial y Gorenflot, 2006; Butler et al., 2008; Grause et al., 2013).

Por ello, según los cuestionarios, un 54,05% de los animales recibieron imidocarb, 40,54% buparvaquona, 2,71% oxitetraciclina y 2,71% una combinación de imidocarb con oxitetraciclina y sulfatrimetoprim.

La buparvaquona es una hidrox-naftoquinona de segunda generación, relacionada con la parvaquona, con características novedosas que la convierten en un compuesto prometedor para la terapia y profilaxis de todas las formas de theileriosis. Ha sido probado extensamente contra *Theileria annulata*, *Theileria parva* y *Theileria sergenti*. La pauta de administración de la buparvaquona es de 2mg/kg administrada en dos dosis separadas 48 h. Cuando se formula como una solución inyectable al 5% (Butalex®) y se inyecta por vía IM, una dosis de 2,5 mg/kg es altamente eficaz contra *Theileria parva* (McHardy et al.,

1985), *Theileria annulata* (McHardy et al., 1985; Dhar et al., 1986) y *Theileria sergenti* (Minami et al., 1985).

El dipropionato de Imidocarb (Imizol®) a una dosis de 4 mg/kg IM, administrado en 4 dosis separadas 72 h es usualmente un tratamiento eficaz para los signos clínicos de la infección por *Theileria equi* (Grause et al., 2013). Este régimen de tratamiento también ha tenido éxito en la esterilización completa de algunos casos. El dipropionato tiene actividad anticolinesterasa, por lo que la administración del fármaco a menudo conlleva numerosos síntomas colaterales, tales como sudoración, agitación, cólico y diarrea (Adams, 1981; Meyer et al., 2005). Generalmente se trata de síntomas transitorios y raramente amenazan la vida del paciente. Por tanto, los caballos sometidos a este tratamiento deben estar en estrecha vigilancia para impedir el desarrollo de complicaciones.

Dado que ambos fármacos son metabólicamente agresivos, se recomienda la administración de suplementos vitamínicos y minerales, así como complementos con Fe, para favorecer la recuperación de la anemia. De hecho, en un 97,30% de los casos de nuestro estudio, se administró una terapia de soporte, correspondiendo el porcentaje más elevado a suplementos vitamínicos (72,22%). En un intento de acelerar la recuperación de la anemia, los compuestos con Fe han sido el segundo tratamiento de soporte administrado con mayor frecuencia (Red Cell®; 38,88%). La duración de la administración de estos suplementos vitamínicos y minerales suele ser de un mes, para poder notar una mejoría clínica.

Además, en un porcentaje más reducido, concretamente un 16,67%, se administraron antiinflamatorios no esteroideos, posiblemente con el objetivo de controlar la fiebre y el mal estado general de los pacientes. Nuestros datos, también denotan que, en Andalucía, las transfusiones sanguíneas no son comunes en caballos con theileriosis, realizándose solo en un 5,57% de los casos.

El pronóstico, en general, ha sido favorable (94,60%). Ello puede deberse a dos motivos, en nuestra opinión. En primer lugar, al ser una zona endémica, los síntomas son claramente reconocidos por el veterinario y se procede al tratamiento, aún sin confirmación

diagnóstica, minimizando el riesgo de progresión clínica del animal y empeoramiento del paciente. Una segunda justificación es el estado de portador crónico de estos animales, cuyo estado inmunitario haría que el proceso clínico no fuese más intenso. En todos los casos, por tanto, con una excepción, la evolución después del tratamiento fue favorable. El único caballo que murió presentaba una anemia muy severa y unas complicaciones orgánicas importantes. Fue uno de los que recibió una transfusión sanguínea por el estado crítico que presentaba. En un primer lugar se intentó estabilizar y luego aplicar el tratamiento con imizol, pero al ser un tratamiento agresivo y el caballo encontrarse en una situación muy grave, no fue capaz de soportar el tratamiento.

10.7. CONCLUSIONES

Este segundo capítulo se basa en la identificación de factores de riesgo (divididos en factores intrínsecos al animal, como especie, raza, sexo, edad...; condiciones ambientales y zona, como temperatura, momento del año, en estabulación o en paddocks, más animales afectados en la explotación...; condiciones asociadas al vector, control de garrapatas...) en el desarrollo de síntomas clínicos en caballos con theileriosis. Además se ha intentado conseguir información acerca de los síntomas que se identifican más frecuentemente, los métodos diagnósticos y los tratamientos que usan de forma rutinaria los veterinarios clínicos de équidos de Andalucía. Las principales conclusiones son las siguientes:

Primera. Los animales afectados con mayor frecuencia fueron, en nuestro estudio, caballos Pura Raza Española, machos enteros, con edades comprendidas entre 6 y 10 años y con uso para paseos y actividad deportiva.

Segunda. Los casos clínicos se concentraron, fundamentalmente en los meses de mayo a junio, cuando existieron condiciones ambientales favorables para el vector, y en animales estabulados, lo cual sugiere un menor desarrollo de inmunidad en estos animales o un estado de portador asintomático con reinfección posterior.

Tercera. El motivo más común de la consulta por parte del propietario fue el dolor cólico. Sin embargo, los síntomas más comunes que encontraron los veterinarios en la exploración física fueron síntomas inespecíficos (inapetencia, pérdida de rendimiento, letargia, fiebre, depresión), junto con anemia y/o ictericia. La presencia de edemas fue menos común y la hemoglobinuria apareció en pocos casos.

Cuarta. Se prefirió el examen hematológico frente al bioquímico tanto como método complementario de diagnóstico. Por otro lado, el método de confirmación diagnóstica más usado fue la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR.

Quinta. El tratamiento elegido preferentemente fue el dipropionato de imidocarb, junto con un tratamiento de soporte, que fue instaurado en un número elevado de animales. La duración media del tratamiento fue de 1 a 4 semanas y la evolución de los casos fue generalmente favorable.

Sexta. A pesar de que las manifestaciones del proceso fueron agudas, los síntomas no fueron graves y la respuesta al tratamiento fue muy favorable, necesitando intervenciones más intensas, como transfusión sanguínea, en un número mínimo de casos, datos que denotan o bien una intervención médica precoz o un estado de inmunidad por parte de los pacientes.

10.8. RESUMEN

Estudio epidemiológico, clínico, laboratorial, diagnóstico y de tratamiento en caballos afectados por *Theileria equi* en Andalucía

Introducción. La theileriosis es una enfermedad endémica en équidos en Andalucía. La identificación de los factores de riesgo en una zona determinada, es esencial para el desarrollo y mejora del diseño de programas de control y prevención, para mantener la salud de los animales y limitar las futuras consecuencias económicas derivadas de la patología. Además, es importante conocer cuáles son los principales síntomas que llevan a los propietarios a consultar a su veterinario, en base a qué pruebas diagnósticas se lleva a cabo la confirmación del proceso y qué protocolos terapéuticos son usados más comúnmente.

Objetivos. 1) Establecer cuáles son los factores de riesgo para la presentación clínica de theileriosis en caballos, que requieren un tratamiento médico, y evaluar la sintomatología clínica asociada. 2) Describir cuáles son los procedimientos de diagnóstico y las opciones terapéuticas utilizadas más comúnmente en Andalucía en animales con sintomatología de theileriosis.

Hipótesis. 1) Que se afectarán con mayor frecuencia los animales jóvenes o de edad avanzada, y que la época del año con mayor incidencia de enfermedad será primavera y verano, por las condiciones climatológicas que favorecen la presencia del vector; 2) Que el método diagnóstico de predilección de los veterinarios clínicos será la serología, frente al método PCR, posiblemente debido a los diferentes costes económicos; 3) Que los tratamientos más usados por los veterinarios serán el dipropionato de imidocarb y/o la buparvaquona.

Material y métodos. El estudio se llevó a cabo mediante cuestionarios, que fueron enviados a veterinarios dedicados a la clínica equina de las provincias de Córdoba, Sevilla,

Huelva, Cádiz y Jaén, mediante correo electrónico. Los cuestionarios eran individuales para cada paciente, de forma que cada veterinario relleno un cuestionario por cada caso clínico. El cuestionario se dividió en cuatro secciones: (1) características del caballo, manejo y condiciones ambientales (2) caracterización clínica, (3) métodos de diagnóstico y (4) tratamiento.

Resultados. Se recibieron un total de 37 cuestionarios completados. La mayor parte de los caballos que presentaron sintomatología fueron Pura Raza Española (40,54%), machos enteros (43,24%), con edades comprendidas entre 6 y los 10 años (59,46%), y usados para paseos (45,95%) y actividad deportiva (32,43%). La mayoría de los casos provinieron de la provincia de Sevilla (40,54%) y durante los meses de mayo (18,92%), junio (24,32%) y julio (16,22%). Un 62,16% de los animales estaban en estabulación. Un 54% de las explotaciones en las que estaban los caballos estudiados, realizaban un tratamiento químico de control de garrapatas. El motivo de la llamada del propietario al veterinario fueron síntomas cólico (40,54%), seguidos de apatía y depresión (29,73%). Con respecto a la exploración física realizada por los veterinarios, los síntomas más comunes fueron inapetencia (91,89%), pérdida de rendimiento o cansancio (91,89%), fiebre (86,49%), depresión (83,78%), mucosas pálidas (83,79%) e ictericia (81,08%). Como parte del procedimiento diagnóstico, se llevó a cabo un examen hematológico (78,38%) y bioquímico sanguíneo (37,84%). Los dos métodos más utilizados para la confirmación diagnóstica, fueron, la prueba de reacción en cadena de la polimerasa, PCR (51,52%) y la inmunofluorescencia indirecta, IFI (27,27%). Los fármacos utilizados más frecuentemente para el tratamiento de la theileriosis fueron el dipropionato de imidocarb (54,05%) y la buparvaquona (40,54%). Un 97,30% de los animales recibieron un tratamiento de soporte, consistente en suplementos vitamínicos (72,22%), o compuestos con Fe (38,88%). La duración media del tratamiento fue de 4 semanas. La evolución del proceso fue favorable (94,60%).

Conclusiones. Esta investigación refleja que, la mayor parte de los casos de theileriosis equina que requieren tratamiento se producen en los meses en los que se encuentra el vector, reflejando una infección aguda. A pesar de ello, el pronóstico es favorable, bien por

una capacidad de diagnóstico rápido bien por la respuesta inmune de los animales provenientes de una zona endémica.

PALABRAS CLAVE. Caballos. Diagnóstico. Factores de riesgo. Sintomatología. Theileriosis. Tratamiento

10.9. SUMMARY

Epidemiological, clinical, laboratorial, diagnostic and treatment characteristics of equine theileriosis in Andalucía

Background. Equine theileriosis is an endemic disease in Andalucía. The identification of risk factors for the infection in a specific location is of pivotal importance for the development and improvement of control and prevention programs, in order to keep health status and to limit economical constrains associated with the disease. Further, it is important to know the main clinical signs that lead the owners to ask for veterinarian services, which diagnostic tests are usually used by the equine practitioners and which therapeutic protocols they follow.

Objectives. 1) To establish risk factors for the clinical presentation of theileriosis in those horses that require a medical intervention and to assess their clinical signs. 2) To describe the diagnostic and therapeutic procedures followed more commonly by the equine clinicians in symptomatic animals in Andalucía.

Hypotheses to test. 1) Young or geriatric animals would be affected more frequently and the seasons of the year with higher prevalence would be spring and summer, because of the presence to the tick vector; 2) Predilect diagnostic procedure would be serology, instead of polymerase chain reaction, PCR, probable because of economic constraints and; 3) The most used treatment options would be imidocarb propionate and/or buvarpaquone.

Material and methods. The research has been based on questionnaires, sent to equine clinicians of Córdoba, Sevilla, Huelva, Cádiz and Jaén by E-mail. Veterinarians completed a questionnaire for each patient. The questionnaire was divided into four sections: 1) characteristics of the affected animal, management and environmental conditions; 2) clinical characteristics; 3) diagnostic methods; 3) therapeutic selections.

Results. A total of 37 questionnaires were fulfilled. Most of the clinically affected horses were Spanishbred horses (40.54%), stallions (43.24%), comprised between 6 and 10 years (59.46%) and used for leisure (45.95%) and sport activities (32.43%). Most of the questionnaires filled came from Sevilla (40.54%) and the clinical cases happened during the months of May (18.92%), June (24.32%) and July (16.22%). A 62.17% of the animals were stabled. The primary complaint of the owners were colic (40.54%), followed by lethargy and depression (29.73%). The most common clinical sign found in the physical examination were: reduced performance or fatigue (91.89%), fever (86.49%), depression (83.78%), pale mucous membranes (83.79%) and icterus (81.08%). Within the diagnostic protocol, hematological analysis was carried out in a 78.38% and serum/plasma/blood biochemistry in a 37.84% of the cases. The most used methods for diagnostic confirmation were PCR (51.52%) and indirect immunofluorescence (27.27%). A 54% of the stables followed chemical control of tick populations. The most frequently administered drugs were imidocarb dipropionato (54.05%) and buparvaquone (40.54%). A 97.30% of the horses required a palliative treatment, consisting in vitamin supplements (72.22%) or/and iron supplements (38.88%). Mean duration of the treatment was 4 weeks. Evolution of the disease was good in most of the horses (94.60%).

Conclusions. The current research shows that, most of the clinical cases of equine theileriosis that require a medical intervention, appears during the months of the year with active ticks (vector), suggesting an acute infection. Despite that, the prognostic is good, may be because of an early diagnostic by the veterinarians, or may be because of the immune response of the animals from endemic areas.

KEY WORDS. Clinical signs. Diagnosis. Horses. Risk factors. *Theileria equi*. Treatment.

10.10. BIBLIOGRAFÍA

- ABUTARBUSH SM, ALQAWASMEH DM, MUKBEL RM, AL-MAJALI AM. (2012). Equine babesiosis: seroprevalence, risk factors and comparison of different diagnostic methods in Jordan. *Transbound Emerg Dis.* 59(1):72-78.
- ADAMS LG. (1981). Clinicopathological aspects of imidocarb dipropionate toxicity in horses. *Res Vet Sci.* 31(1):54-61.
- ALANAZI AD, SAID AE, MORIN-ADELIN V, ALYOUSIF MS, SLAPETA J. (2014). Quantitative PCR detection of *Theileria equi* using laboratory workflows to detect asymptomatic persistently infected horses. *Vet Parasitol.* 206(3-4):138-145.
- AMBAWAT HK, MALHOTRA DV, KUMAR S, DHAR S. (1999). Erythrocyte associated haemato-biochemical changes in *Babesia equi* infection experimentally produced in donkeys. *Vet Parasitol.* (85):319-24.
- 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* horses in western Mexico by nested PCR. *Parasitol Intern.* 66(1):821-824.
- BARTOLOMÉ DEL PINO LE, NARDINI R, VENEZIANO V. (2016). *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in central-Southern Italy: sero-molecular survey and associated risk factors. *Ticks Ticks Borne Dis.* 7(3):462-469.
- BHOORA R, BUSS P, GUTHRIE AJ, PENZHORN BL, COLLINS NE. (2010). Genetic diversity of piroplasms in plains zebra (*Equus quagga burchellii*) and Cape mountain zebra (*Equus zebra zebra*) in South Africa. *Vet Parasitol.* 174(1-2):145-149.
- BUTLER CM, NIJHOF AM, VAN DER KOLK JH, DE HASETH OB, TAOUFIK A, JONGEJAN F, HOUWERS DJ. (2008). Repeated high dose imidocarb dipropionate treatment did not eliminate *Babesia caballi* from naturally infected horses as determined by PCR-reverse line blot hybridization. *Vet Parasitol.* 151(2-4):320-322.
- CAMACHO, AT, GUITIAN, FJ, PALLAS, E, GESTAL, JJ, OLMEDA, AS, HABELA, MA, TELFORDRD, SR, SPIELMAN, A. (2005). *Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain. *Trop Anim Health Prod.* 37:293-302.
- CARBONNEAU E, DE PASILLE AM, RUSHEN J, TALBOT BG, LACASSE P. (2012). The effect of incomplete milking or nursing on milk production, blood metabolites, and immune functions of dairy cows. *J Dairy Sci.* 95:6503-6512.
- CHASTAGNER A, BAILLY X, LEBLOND A, PRADIER S, VOUREC'H G. (2013). Single genotype of *Anaplasma phagocytophilum*

identified from ticks, Camargue, France. *Emerg Infect Dis.* 19(5):825-827.

CHILTON NB, BULL CM. (1994). Influence of environmental factors on oviposition and egg development in *Amblyomma limbatum* and *Aponomma hydrosauri* (Acari: Ixodidae). *Int J Parasitol.* 24(1):83-90.

CMA. (2010). Consejería de Medio Ambiente de Andalucía, en colaboración con la Agencia Estatal de Meteorología.

COLLARD BL, BOETTCHER PJ, DEKKERS JCM, PETITCLERC D, SCHAEFFER LR. (2000). Relationships between energy balance and health traits of dairy cattle in early lactation. *J Dairy Sci.* 83:2683-2690.

DAVITKOV D, VUCICEVIC M, STEVANOVIC J, KRSTIC V, SLIJEPCEVIC D, GLAVINIC U, STANIMIROVIC Z. (2016). Molecular detection and prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses of central Balkan. *Acta Parasitol.* 61(2):337-342.

DE WAAL DT, VAN HEERDEN J. (2004). Equine piroplasmiasis. *Infectious Diseases of Livestock.* En: Coetzer JAW, Tustin RC, eds., 2nd ed. Cape Town, South Africa: Oxford University Press, pp. 425-433.

DE WAAL DT. (1992). Equine piroplasmiasis: a review. *Br Vet J.* 148:6-14.

DHAR S, MALHOTRA DV, BHUSHAN C, GAUTAM OP. (1986). Chemotherapy of

Theileria annulata infection with buparvaquone. *Vet Rec.* 119(25-26):635-636.

DIANA A, GUGLIELMINI C, CANDINI D, PIETRA M, CIPONE M. (2007). Cardiac arrhythmias associated with piroplasmiasis in the horse: a case report. *Vet J.* 174:193-195.

DONNELLAN CM, MARAIS HJ. (2009). Equine piroplasmiasis. En: *Infectious diseases of the horse.* Mair TS, Hutchinson RE, eds. Cambridgeshire, England, UK, pp. 333-340.

DONNELLY J, JOYNER LP, FRANK C. (1980). Quantitative epidemiological studies on the prevalence of babesiosis in horses in Kuwait. *Trop Anim Health Prod.* 12(4):253-258.

DOS SANTOS TM, ROIER EC, 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. *Rev Bras Parasitol Vet.* 3:235-241.

FARKAS R, TÁNCZOS B, GYURKOVSKY M, FÖLDVÁRI G, SOLYMO SIN, EDELHOFER R, HORNOK S. (2013). Serological and molecular detection of *Theileria equi* infection in horses in Hungary. *Vet Parasitol.* 192(1-3):143-148.

FERREIRA EP, VIDOTTO O, ALMEIDA JC, RIBEIRO LP, BORGES MV, PEQUENO WH, STIPP DT, DE OLIVEIRA CJ, BIONDO AW, VIEIRA TS, VIEIRA RF. (2016). Serological and molecular detection of *Theileria equi* in sport

horses of northeastern Brazil. *Inmunol Microbiol.* 47:72-76.

FRERICHS WM, ALLEN PC, HOLBROOK AA. (1973). Equine piroplasmosis (*Babesia equi*): Therapeutic trials of imidocarb dihydrochloride in horses and donkeys. *Vet Rec.* 93:73-75.

FRERICHS WM, HOLBROOK AA. (1974). Treatment of equine piroplasmosis (*B. caballi*) with imidocarb dipropionate. *Vet Rec.* 95:188-189.

FRIEDHOFF KT. (1982). Piroplasmas of horses-- impact on the international horse trade. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 95(19):368-374.

GARCÍA-BOCANEGRA I, ARENAS-MONTES A, HERNÁNDEZ E, ADASZEK L, CARBONERO A, ALMERIA JA, JAÉN-TÉLLEZ JA, GUTIERREZ PALOMINO P, ARENAS A. (2013). Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. *Vet J.* 195:172-178.

GOFF WL, STORSET AK, JOHNSON WC, BROWN WC. (2006). Bovine splenic NK cells synthesize IFN-gamma in response to IL-12-containing supernatants from *Babesia bovis*-exposed monocyte cultures. *Parasite Immunol.* 28(5):221-228.

GRANDI G, MOLINARI G, TITTARELLI M, SASSERA D, KRAMER LH. (2011). Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses from northern Italy. *Vector Borne Zoonot.* 11(7):955-956.

GRAUSE JF, UETI MW, NELSON JT, KNOWLES DP, KAPPEMEYER LS, BUNN TO. (2013). Efficacy of imidocarb dipropionate in eliminating *Theileria equi* from experimentally infected horses. *Vet J.* 196:541-546.

GUIDI G, PRADIER S, LEBERT I, LEBLOND A. (2015). Piroplasmosis in an endemic area: analysis of the risk factors and their implications in the control of theileriosis and babesiosis in horses. *Parasitol Res.* 114(1):71-83.

HALOS L, BORD S, COTTÉ V, GASQUI P, ABRIAL D, BARNOUIN J, BOULOUIS HJ, VAYSSIER-TAUSSAT M, VOURC'H G. (2010). Ecological factors characterizing the prevalence of bacterial tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in pastures and woodlands. *Appl Environ Microbiol.* 76(13):4413-4420.

HEUCHERT CM, DE GIULLI V JR, DE ATHAIDE DF, BÖSE R, FRIEDHOFF KT. (1999). Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. *Vet Parasitol.* 85(1):1-11.

INGVARTSEN KL, MOYES K. (2013). Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *Animal. Suppl* 1:112-122.

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 piroplasmosis. *Parasitol Res.* 106(3):709-713.

KARATEPE B, KARATEPE M, ÇAKMAK A, KARAER Z, ERGUN G. (2009). Investigation of

seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Nigde province, Turkey. Trop Anim Health Prod. 41(1):109-113.

KIM CM, BLANCO LB, ALPHASSAN 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(2-4):158-163.

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. Vet Parasitol. 169(3-4):273-278.

KUMAR S, KUMAR R, GUPTA AK, YADAV SC, GOYAL SK, KHURANA SK, SINGH RK. (2013). Development of EMA-2 recombinant antigen based enzyme-linked immunosorbent assay for seroprevalence studies of *Theileria equi* infection in Indian equine population. Vet Parasitol. 198(1-2):10-17.

LAUS F, SPATERNA A, FAILLACE V, VERONESI F, RAVAGNAN S, BERIBÉ F, CERQUETELLA M, MELIGRANA M, TESEI B. (2015). Clinical investigation in *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Italian donkeys. BMC Vet Res. 11:100. Doi:10.1186/s12917-015-0411-7

LEBLOND A, PRADIER S, PITEL PH, FORTIER G, BOIREAU P, CHADOEUF J, SABATIER P. (2005). An epidemiological survey of equine anaplasmosis (*Anaplasma*

phagocytophilum) in southern France. Rev Sci Tech. 24(3):899-908.

LÉGER E, VOURC'H G, VIAL L, CHEVILLON C, MCCOY KD. (2013). Changing distributions of ticks: causes and consequences. Exp Appl Acarol. 59(1-2):219-244.

MAHONEY DF, ROSS DR. (1972). Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. Aust Vet J. 48(5):292-298.

MCHARDY N, WEKESA LS, HUDGSON AT, RANDALL AW. (1985). Antitheilerial activity of BW720C (buparvaquone): a comparison with parvaquone. Res Vet Sci. 39(1):29-33.

MEYER C, GUTHRIE AJ, STEVENS KB. (2005). Clinical and clinicopathological changes in 6 healthy ponies following intramuscular administration of multiple doses of imidocarb dipropionate. J S Afr Vet Assoc. 76:26-32

MINAMI T, NAKANO T, SHIMIZU S, SHIMURA K, FUJINAGA T, ITO S. (1985). Efficacy of naphthoquinones and imidocarb dipropionate on *Theileria sergenti* infections in splenectomized calves. Nihon Juigaku Sasshi. 47(2):297-300.

MORETTI A, MANGIL A, 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. Vet J. 184:346-350

- MUNKHJARGAL T, YOKOYAMA N, IGARASHI I, TERKAWI MA, BYAMBAA B, BAYARSAIKHAN D, BYAMBAA B, TERKAWI MA, YOKOYAMA N, IGARASHI I. (2013). Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province, Mongolia. *Infect Genet Evol.* 16:178-185.
- PFÄFFLE M, LITWIN N, MUDERS SV, PETNEY TN. (2013). The ecology of tick-borne diseases. *Int J Parasitol.* 43(12-13):1059-1077.
- PIANTEDOSI D, D'ALESSIO N, DI LORIA A, DI PRISCO F, MARIANI U, NEOLA B, SANTORO M, MONTAGNARO S, CAPELLI G, VENEZIANO V. (2014). Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in donkeys from Southern Italy. *Vet J.* 202(3):578-582.
- RAPOPORT A, AHARONSON-RAZ K, BERLIN D, TAL S, GOTTLIEB Y, KLEMENT E, STEINMAN A. (2014). Molecular characterization of the *Babesia caballi* rap-1 gene and epidemiological survey in horses in Israel. *Infect Genet Evol.* 23:115-120.
- ROTHSCHILD CM. (2013). Equine piroplasmiasis. *J Equine Vet Sci.* 3:497-508.
- RÜEGG SR, HEINZMANN D, BARBOUR AD, TORGERSON PR. (2008). Estimation of the transmission dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses. *Parasitology.* 135(5):555-565.
- SCOLES GA, UETI MW. (2015). Vector ecology of equine piroplasmiasis. *Ann Rev Entomol.* 60:561-580.
- 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. *Vet Parasitol.* 156(3-4):173-177.
- SHKAP V, COHEN I, LEIBOVITZ B, SAVITSKY PIPANO E, AVNI G, GIGER U, KAPPEMEYER L, KNOWLES D. (1998). Seroprevalence of *Babesia equi* in Israel using competitive inhibition Elisa and IFA assays. *Vet Parasitol.* 76: 251-259.
- 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. *Vet Parasitol.* 187(3-4):558-562.
- SUMBRIA D, DAS SINGLA L, SHARMA A. (2016). *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection of equids in Punjab, India: a serological and molecular survey. *Trop Animal Health Prod.* 48(1):45-52.
- TAMZALI Y. (2013). Equine piroplasmiasis: an updated review. *Equine Vet Educ.* 25(11):590-598.
- TASAKI Y, MIURA N, IYORI K, NISHIFUJI K, ENDO Y, MOMOI Y. (2013). Generalized alopecia with vasculitis-like changes in a dog with babesiosis. *J Vet Med Sci.* 75(10):1367-1369.

- UETI MW, PALMER GH, SCOLES GA, KAPPEMEYER LS, KNOWLES DP. (2008). Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the apicomplexan parasite *Babesia equi*. *Infect Immun*. 76(8):3525-3529.
- VANWAMBEKE SO, SUMILO D, BORMANE A, LAMBIN EF, RANDOLPH SE. (2010). Landscape predictors of tick-borne encephalitis in Latvia: land cover, land use, and land ownership. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 10(5):497-506.
- VIAL HJ, GORENFLOT A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Vet Parasitol*. 138(1-2):147-160.
- VIEIRA RF, BIONDO AW, NASCIMENTO DD, VIEIRA TS, FINGER MA, 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 Parana State, southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*. 4(6):537-541.
- VRANOVA M, ALLOGGIO I, QABLAN M, VYSKOCIL M, BAUMEISTEROVA A, SLOBODA M, PUTNOVA L, VRTKOVA I, MODRY D, HORIN P. (2011). Genetic diversity of the class II major histocompatibility DRA locus in European, Asiatic and African domestic donkeys. *Infect Genet Evol*. 11:1136-1141.
- WISE LN, KAPPEMEYER LS, MEALEY RH, KNOWLES DP. (2013). Review of equine piroplasmiasis. *J Vet Intern Med*. 27: 1334-1346.
- WISE LN, PETZEL-MCCLUSKOWY AM, MEALEY RH, KNOWLES DP. (2014). Equine piroplasmiasis. *Vet Clin North Am: Equine Pract*. 30(3):677-693.
- YOUNG AS, LEITCH BL. (1981). Production of *Rhipicephalus appendiculatus* with high infections of *Theileria parva*. *J Parasitol*. 67(5):751-752.
- ZANET S, BASSANO M, TRISCIUOGLIO A, TARICCO I, FERROGLIO E. (2017). Horses infected by Piroplasms different from *Babesia caballi* and *Theileria equi*: species identification and risk factors analysis in Italy. *Vet Parasitol*. 236:38-41.
- ZOBBA R, ARDU M, NICCOLINI S. (2008). Clinical and laboratory findings in equine piroplasmiasis. *J Equine Vet Sci*. 28:301-308.



11. ESTUDIO III

CASO CLÍNICO: Infección Subclínica por *Theileria equi* y Rabdomiólisis en tres Caballos de Resistencia

11.1. INTRODUCCION

Theileria equi y *Babesia caballi* son dos parásitos hematoprotzoarios, transmitidos por garrapatas, causantes de la piroplasmosis en équidos. *Theileria equi* fue asignada inicialmente al género *Babesia*, si bien diversos estudios moleculares y la confirmación de sus estados pre-eritrocitarios en su ciclo biológico, han hecho que en la actualidad se la clasifique como *Theileria equi* (Mehlhorn y Schein, 1998; Camacho et al., 2005).

Se ha estimado que, aproximadamente un 90% de la población equina mundial vive en zonas endémicas de piroplasmosis (Wise et al., 2013; 2014). Las zonas endémicas incluyen numerosas regiones geográficas de Europa, África y Asia, si bien el desarrollo de los transportes y el crecimiento de los mercados internacionales de équidos han incrementado de forma considerable el riesgo de la introducción del parásito en países en los que previamente no se había diagnosticado esta enfermedad. Por tanto, la piroplasmosis en general, y la theileriosis equina en particular, se han convertido en unas enfermedades preocupantes, debido a la importancia creciente de los desplazamientos de caballos, y por ello, en los últimos años, se ha prestado una enorme atención al desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico, más sensibles y fiables (Alanazi et al., 2014; Kumar et al., 2015; Liu et al., 2016; Sumbria et al., 2016; Ayala-Valdovinos et al., 2017), nuevas modalidades terapéuticas (Grause et al., 2013; Hines et al., 2015; Omar et al., 2016), e investigación de factores de riesgo, encaminados a su control (Kouam et al., 2010; García-Bocanegra et al., 2013; Piantedosi et al., 2014; Guidi et al., 2015; Bartolomé del Pino et al., 2016; Davitkov et al., 2016; Ferreira et al., 2016).

Además, la theileriosis equina, y en general la piroplasmosis, implican graves pérdidas económicas, debido al coste del tratamiento, particularmente en caballos infectados, abortos, pérdida de rendimiento, muerte en casos extremos y con mucha frecuencia, restricciones al cumplimiento de los requisitos de exportación o participación en eventos deportivos ecuestres.

En el sur de Europa, la infección por *Theileria equi* se considera endémica, siendo más común y frecuente que la producida por *Babesia caballi*, si bien en muchos casos ambas pueden cursar de forma asintomática (Friedhoff et al., 1990; Camacho et al., 2005). De hecho, se han realizado estudios epidemiológicos en Portugal (Ribeiro et al., 2013), Italia (Piantedosi et al., 2014; Laus et al., 2015; Bartolomé del Pino et al., 2016; Zanet et al., 2017), Grecia (Kouam et al., 2010) y por supuesto, en España (Camacho et al., 2005; Adaszek et al., 2012; García-Bocanegra et al., 2013).

11.2. DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS

Este tercer capítulo describe tres casos clínicos de caballos de raid o resistencia, que fueron considerados ‘aptos’ en el examen veterinario previo a una competición. El rendimiento anterior había sido adecuado y los tres animales desarrollaron síntomas agudos de rabdomiólisis, de intensidad leve a severa, durante el ejercicio. En los tres casos, una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue positiva a *Theileria equi* (Figura 17).

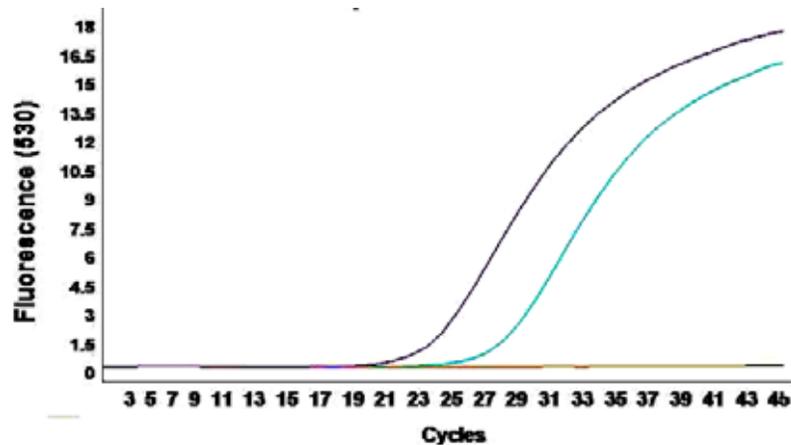


Figura 17. Curva de amplificación de la reacción en cadena de polimerasa de *Theileria equi* en caballos (línea roja o línea basal: control negativo; línea violeta: control positivo; línea azul: muestra positiva) (Eje X: ciclos de PCR; Eje Y: Fluorescencia (Imagen cedida por el Dr. Bartolomé Garfía, Laboratorio Garfía, Córdoba, España))

11.2.1. Descripción del caso 1

El caballo 1 era un semental, PRá (Pura Raza árabe), de 6 años de edad, que inició una competición de resistencia de 80 km. Previamente había competido en 6 pruebas sobre un recorrido de 40 km y una de 80 km, terminando todos ellos de forma correcta. La competición en la cual se produjo el caso, se celebró en el mes de marzo, con una

temperatura media de 17,5°C y una humedad ambiental relativa de 75%. El terreno en el cual se llevó a cabo la competición era rocoso, con cuevas de pendiente moderada.

A los 7 km del inicio de la competición, el caballo desarrolló una rhabdomiólisis súbita, de intensidad moderada, con rigidez muscular y orina de color oscuro. El propietario, en este momento, decidió abandonar la competición. El caballo se introdujo en un tráiler y se transportó hasta el lugar de las inspecciones veterinarias. El transporte duró unos 30 minutos.

En el momento de la inspección, el caballo estaba letárgico, con dolor y levemente deshidratado. Las constantes vitales fueron las siguientes (Tabla 30).

TABLA 30. Parámetros clínicos del caballo del caso 1

(FC, frecuencia cardiaca; FR, frecuencia respiratoria; TRC, tiempo de relleno capilar);
en negrita, valores anormales

Parámetro y unidad	Caso 1	Valores de referencia
FC (lat/min)	72	28-44
FR (resp/min)	32	10-24
TRC (s)	1,5	<1 s

Para aliviar la sintomatología, el caballo se introdujo en un box y se le administró fenilbutazona intravenosa (IV) (4,4 mg/kg) y fluidoterapia (8 l de solución salina IV suplementada con ClK). A los 90 minutos, las constantes vitales se habían normalizado (FC 42 lat/min; FR 16 resp/min), la orina era clara y el caballo empezó a mostrar interés por la bebida y por la comida. El resto de la exploración clínica (color de las mucosas, TRC, auscultación abdominal, pulso digital...) estuvo dentro de los límites normales.

Al final del día, aproximadamente unas 12 h después del comienzo de la sintomatología, se examinó de nuevo al caballo. Al encontrarse en buenas condiciones, se autorizó su desplazamiento de vuelta a su residencia habitual. El transporte tuvo una duración aproximada de unas 6 h y el caballo llegó en buenas condiciones.

Al día siguiente, el caballo estaba físicamente normal, pero su veterinario habitual apreció las mucosas ligeramente pálidas. Por este motivo, así porque solo recorrió 7 km en competición, se le recomendó realizar una analítica, cuyos resultados se presentan en la tabla 31.

TABLA 31. Resultados analíticos del caballo del caso 1, el día 1 tras la competición (A) y 2 meses después del tratamiento (B)

(*HB, hemoglobina; HTO, valor hematócrito; VCM, volumen corpuscular medio; GB, glóbulos blancos; NEU, neutrófilos; LINF, linfocitos; MON, monocitos; PLT, plaquetas; BIL, bilirrubina; BUN, urea; CREAT, creatinina; PPT, proteínas plasmáticas totales; FIB, fibrinógeno; CK, creatín kinasa; AST, aspartato aminotransferasa; ALP, fosfatasa alcalina; GGT, γ -glutamyl transferasa*); en negrita, valores anormales

Parámetro y unidad	A	B	Rango referencia
HB (g/dl)	10,3	13,3	12,0-14,0
HTO (%)	26,0	39,0	35,0-35,0
VCM (fl)	54,0	52,0	37,0-55,0
GB (10³/μl)	11,1	8,74	7,00-13,0
NEU (10³/μl)	7,10	5,50	2,50-7,50
LINF (10³/μl)	3,77	3,10	1,50-5,00
MON (10³/μl)	0,21	0,12	0,00-0,50
PLT (10³/μl)	178	139	100-350
BIL (mg/dl)	2,40	1,10	0,80-1,80
BUN (mg/dl)	40,0	34,0	10,0-35,0
CREAT (mg/dl)	1,60	1,52	0,80-1,80
PPT (g/dl)	6,80	6,60	6,00-7,50
FIB (mg/dl)	800	200	200-400
CK (UI/l)	10340	277	150-350
AST (UI/l)	6320	579	220-440
ALP (UI/l)	156,0	145,0	70,0-210
GGT (UI/l)	12	14	10-40

Al encontrarse niveles inferiores a lo esperado para HB y HTO, se solicitó una prueba PCR, que dio positiva a *Theileria equi* y negativa a *Babesia caballi* y *Anaplasma phagocytophilum*. Otras alteraciones laboratoriales de este animal, como se aprecian en la tabla 31, fueron hiperbilirrubinemia, ligera azotemia, y actividades enzimáticas elevadas de CK y AST.

El caballo se trató con dipropionato de imidocarb (Imizol®, 4,0 mg/kg, intramuscular IM, cada 72 h, 4 tratamientos), y con un suplemento oral de vitamina B12, otras vitaminas y Fe. Durante los días de tratamiento, el caballo permaneció en un paddock, con otros caballos. Dos meses después, se volvió a repetir la analítica, hallando que las alteraciones laboratoriales habían desaparecido (Tabla 31).

11.2.2. Descripción del caso 2

El caso 2 era una yegua Angloárabe (Aa), de 12 años de edad, entrenada para competiciones de resistencia, que tomó parte en una prueba de 160 km. Anteriormente, la yegua había participado en varias pruebas de 160 km de forma exitosa. De hecho, había competido en el Campeonato de España correctamente. Por ello, su nivel de forma física era alto.

La competición se celebró en el mes de octubre, con una temperatura media de 21,2°C y con una humedad relativa media de 69,2%. El terreno era rocoso, con pendientes de intensidad moderada. El jinete describió que la yegua experimentó una parada súbita a los 18 km de iniciar la competición, rehusando seguir andando. Por ello, se procedió a su transporte hasta los servicios veterinarios del evento.

En el momento de la exploración, la yegua presentaba excitación, con síntomas de dolor y ollares dilatados. Las constantes vitales fueron las siguientes (Tabla 32):

TABLA 32. Parámetros clínicos de la yegua del caso 2

(FC, frecuencia cardiaca; FR, frecuencia respiratoria); en negrita, valores anormales

Parámetro y unidad	Caso 2	Rango de referencia
FC (lat/min)	68	28-44
FR (resp/min)	24	10-24

Como en este momento presentaba un dolor moderado a intenso en la musculatura glútea a la palpación, se realizó un diagnóstico de rabdomiólisis. Los resultados laboratoriales de este animal se presentan en la tabla 33.

TABLA 33. Resultados analíticos de la yegua del caso 2, al llegar a los servicios veterinarios durante la competición (A), 3,5 h después del tratamiento (B) y 1,5 meses después (C)

(*HB, hemoglobina; HTO, valor hematócrito; VCM, volumen corpuscular medio; GB, glóbulos blancos; NEU, neutrófilos; LINF, linfocitos; MON, monocitos; PLT, plaquetas; BIL, bilirrubina; BUN, urea; CREAT, creatinina; PPT, proteínas plasmáticas totales; FIB, fibrinógeno; CK, creatín kinasa; AST, aspartato aminotransferasa; ALP, fosfatasa alcalina; GGT, γ -glutamil transferasa*) n.d.: no disponible; en **negrita**, valores anormales

Parámetro y unidad	A	B	C	Rango referencia
HB (g/dl)	13,2	11,3	13,5	12,00-14,00
HTO (%)	39,0	32,2	38,0	35,00-45,00
GB (10³/μl)	8,32	7,12	8,10	7,00-13,0
NEU (10³/μl)	5,50	4,31	5,52	2,50-7,50
LINF (10³/μl)	2,20	2,54	2,12	1,50-5,00
MON (10³/μl)	0,300	0,270	0,260	0,00-0,500
PLT (10³/μl)	170	103	134	100-350
BIL (mg/dl)	1,45	1,20	1,20	0,80-1,80
BUN (mg/dl)	32,0	25,0	28,0	10,0-35,0
CREAT (mg/dl)	1,60	0,90	1,20	0,80-1,80
PPT (g/dl)	7,40	6,30	6,50	6,00-7,50
FIB (mg/dl)	n.d.	600	300	200-400
CK (UI/l)	11320	9320	260	150-350
AST (UI/l)	5340	7320	350	220-440
ALP (UI/l)	200,2	189,5	170,0	70,0-210,0
GGT (UI/l)	32	25	15	10-40

El tratamiento para este animal consistió en fenilbutazona IV (4,4 mg/kg, 2 veces/día), y un suplemento con vitamina E y Se. La yegua permaneció en observación, y

unas 3,5 h después de la exploración inicial, miccionó una orina de color oscuro (Foto 1). Por ello, se realizó una fluidoterapia, administrando 5 l IV de Ringer Lactato.



FOTO 2. Orina en un caballo de raid con rabdomiólisis, al inicio (primera jeringa por la izquierda) y en respuesta a la fluidoterapia (Imagen cedida por D. Juan Roldán Romero, Equinuvi, Córdoba, España)

Cinco h después, la orina era de color más claro y se llevó a cabo una segunda analítica, cuyos resultados se presentan en la tabla 33 (resultados B). En este momento, el dolor muscular aún persistía, pero era de menor intensidad. Por la tarde, cuando todos los caballos habían concluido la competición, se volvió a examinar a la yegua. El examen clínico fue irrelevante, todos los parámetros clínicos estaban dentro de la normalidad, y como el transporte hasta su residencia habitual era corto (menos de 100 km), se consideró seguro consentir dicho desplazamiento.

A partir de este momento, se efectuó un seguimiento del estado de la yegua vía telefónica con el propietario y con el veterinario del animal. Dos días después, el veterinario informó de que la yegua presentaba anorexia, depresión, fiebre e ictericia. En este momento, no se llevó a cabo una analítica sanguínea, pero se realizó un análisis PCR, hallándose resultados positivos para *Theileria equi* y negativo para *Babesia caballi*. La

yegua fue tratada con dipropionato de imidocarb (4,0 mg/kg cada 72 h, 4 tratamientos) y oxitetraciclina (7,7 mg/kg IV, cada 24 h, durante 7 días). La yegua mejoró sustancialmente y los resultados de la analítica sanguínea, efectuada 1,5 meses después, se muestran en la tabla 33.

11.2.3. Descripción del caso 3

El caso 3 era un caballo cruzado, macho castrado, de 7 años de edad, que competía en pruebas de resistencia sobre 120 y 160 km. El animal inició una competición de 120 km, durante el mes de abril, con una temperatura ambiental media de 24,3°C y una humedad ambiental relativa media de 83,4%. La competición se llevó a cabo en un terreno rocoso, cerca de la playa y por tanto, la mayor parte del recorrido fue terreno de playa (arena) y pedregoso-rocoso.

Tras cubrir 16 km, el jinete apreció que el caballo no tenía un comportamiento normal, habitual para él en competición ('el caballo estaba raro'), de modo que, aunque continuó en competición, redujo la velocidad. Después de 5 km más al trote (21 km de carrera), el caballo no quería avanzar, por lo que el jinete decidió abandonar la competición.

Cuando el caballo fue examinado por primera vez desde su retirada de la competición (unos 20 min después de abandonar), el examen físico fue irrelevante. Las constantes vitales, como se muestran en la tabla 34, estaban dentro de los límites normales para un caballo en competición.

TABLA 34. Parámetros clínicos del caballo del caso 3 en la primera inspección veterinaria, tras abandonar la competición

(FC, frecuencia cardiaca; FR, frecuencia respiratoria; TR, temperatura rectal)

Parámetro y unidad	Caso 3 ²³	Rango de referencia
FC (lat/min)	48	28-44
FR (resp/min)	16	10-24
TR (°C)	37,8	37,0-38,3

El caballo permaneció en observación en un paddock, con acceso a la comida (heno), a la sombra y 1 h más tarde, empezó con taquipnea (32 lat/min) y dilatación de ollares. En este momento, se encontró taquicardia (64 lat/min) y comenzó a mostrar síntomas de dolor, intentando revolcarse por el suelo. Se realizó una exploración digestiva, la motilidad intestinal estaba ligeramente reducida, no se evidenció ningún hallazgo anormal a la exploración rectal, se encontraron heces duras y secas en el recto y el sondaje nasogástrico fue improductivo. Los cascos no presentaban dolor, no estaban calientes ni el pulso digital estaba aumentado. La palpación profunda de la musculatura glútea mostró un malestar moderado, se encontró una contractura muscular en el miembro pelviano derecho e inflamación marcada en la musculatura del miembro pelviano izquierdo (Foto 2).

²³ Estos valores se consideraron normales, ya que el caballo acababa de hacer ejercicio (20 min). Los valores de referencia que se presentan provienen de animales en reposo.



FOTO 3. Caballo de raid del caso 3. Se observa una contractura en el miembro pelviano derecho y un aumento de tamaño de la musculatura glútea en el miembro pelviano izquierdo (*Imagen cedida por la Dra. Ana Muñoz Juzado*)

La analítica en este momento se presenta en la tabla 35.

TABLA 35. Resultados analíticos del caballo del caso 3, a la llegada a los servicios veterinarios, tras su retirada de la competición (A), dos meses después del tratamiento (B)

(*HB*, hemoglobina; *HTO*, valor hematócrito; *VCM*, volumen corpuscular medio; *GB*, glóbulos blancos; *NEU*, neutrófilos; *LINF*, linfocitos; *MON*, monocitos; *PLT*, plaquetas; *BIL*, bilirrubina; *BUN*, urea; *CREAT*, creatinina; *PPT*, proteínas plasmáticas totales; *FIB*, fibrinógeno; *CK*, creatín kinasa; *AST*, aspartato aminotransferasa; *ALP*, fosfatasa alcalina; *GGT*, γ -glutamil transferasa); *n.d.*, no disponible; en **negrita**, valores anormales

Parámetro y unidad	A	B	Rango referencia
HB (g/dl)	13,20	12,90	12,0-14,0
HTO (%)	37,0	36,0	35,0-35,0
GB (10³/μl)	10,32	8,35	7,00-13,0
NEU (10³/μl)	6,90	5,40	2,50-7,50
LINF (10³/μl)	2,80	2,45	1,50-5,00
MON (10³/μl)	0,32	0,20	0,00-0,50
PLT (10³/μl)	115	167	100-350
BIL (mg/dl)	1,10	0,95	0,80-1,80
BUN (mg/dl)	33,0	29,0	10,0-35,0
CREAT (mg/dl)	1,45	1,05	0,80-1,80
PPT (g/dl)	6,90	6,40	6,00-7,50
FIB (mg/dl)	n.d.	330	200-400
CK (UI/l)	12430	296	150-350
AST (UI/l)	7320	540	220-440
ALP (UI/l)	123,0	131,0	70,0-210
GGT (UI/l)	15,0	14,0	10,0-40,0

Con estos resultados de la analítica, se efectuó un diagnóstico de rabdomiólisis por ejercicio, y se inició el tratamiento, consistente en fenilbutazona (4,4 mg/kg IV), Se y vitamina E IV y diazepam (0,25 mg/kg), como relajante muscular. No se administró

fluidoterapia. El caballo mejoró, la contractura muscular se redujo durante las 6 h siguientes, y en este caso, el dueño decidió permanecer en el lugar de la competición, en los servicios veterinarios locales, durante toda la noche.

Al día siguiente, el caballo estaba letárgico, y la anemia era muy evidente a la exploración física, con mucosas muy pálidas. Se realizó un microhematócrito y se halló un valor del 28%. El dolor de la musculatura glútea del miembro pelviano izquierdo y la contractura en el miembro pelviano derecho aún persistían, pero eran de menor intensidad.

Debido a la anemia, se envió una muestra al laboratorio para una prueba PCR, que salió positiva a *Theileria equi* y negativa a *Babesia caballi*. El caballo se transportó a su residencia habitual y su veterinario comenzó el tratamiento para el hemoparásito, consistente en dipropionato de imidocarb (4,0 mg/kg, IM, cada 72 h, 4 tratamientos) y oxitetraciclina (7,7 mg/kg IV, 1 vez/día, 5 días). Dos meses después, el caballo parecía clínicamente haberse recuperado. Se hizo otra analítica, cuyos resultados se presentan en la tabla 35 (B), observándose valores de AST aún elevados.

11.3. DISCUSIÓN

En este capítulo, se describen tres casos de caballos de deporte, concretamente de raid o resistencia, que desarrollaron una rabdomiólisis al inicio del ejercicio, a pesar de haber sido entrenados de forma adecuada para recorrer distancias notablemente superiores a las que recorrieron el día en el cual presentaron síntomas de rabdomiólisis. En los tres casos, los dueños y/o jinetes documentaron que los caballos nunca habían tenido una lesión muscular de este tipo durante el entrenamiento y/o la competición y un seguimiento telefónico de los casos, indicó que los caballos 1 y 2 tampoco volvieron a tener rabdomiólisis en los 6 meses posteriores al evento. No se puede describir el comportamiento deportivo del caballo 3, por perder el contacto con el propietario.

La enfermedad clínica asociada a piroplasmosis, se caracteriza por fiebre, anemia, ictericia, hepatomegalia, esplenomegalia, letargia, hemoglobinuria y en casos más extremos, muerte (Camacho et al., 2005; Zobba et al., 2008; De Waal, 2012; Rothschild, 2013; Wise et al., 2013; 2014). Parece ser que los caballos son más susceptibles a la enfermedad clínica que las mulas y burros, y los animales jóvenes, igualmente, más susceptibles que los adultos (Wise et al., 2013; 2014; Piantedosi et al., 2014; Laus et al., 2015). La mortalidad es poco común, con una frecuencia inferior al 10% en animales endémicos. No obstante, este porcentaje se puede elevar hasta el 50% en caso de introducción de animales susceptibles, provenientes de zonas no endémicas, en zonas endémicas (Camacho et al., 2005; Rothschild, 2013; Wise et al., 2013; 2014). Por el contrario, los animales de zonas endémicas, generalmente desarrollan un estado de premunidad, caracterizada por actuar como portadores crónicos. Estos portadores inaparentes, clínicamente sanos, pueden experimentar recaídas de la enfermedad clínica, en asociación a estrés, ejercicio extenuante, inmunosupresión y administración de esteroides (Oladosu et al., 1992; Hailat et al., 1997; Wise et al., 2014). Esto no se ha descrito para *Babesia caballi*.

En el presente estudio, los tres caballos procedían de zonas endémicas (uno de ellos de Cataluña, dos de la Comunidad Valenciana), si bien no habían desarrollado síntomas de

theileriosis, ni habían sido tratados previamente de la misma. No obstante, dos de ellos (caso 1 y caso 2), habían convivido con caballos que sí habían tenido y habían sido tratados de piroplasmosis (información aportada por sus veterinarios).

El síntoma inicial y más evidente de los tres casos, fue rabdomiólisis al inicio del ejercicio y tras recorrer distancias pequeñas, en comparación con los km sobre los cuales habían competido previamente de forma exitosa y en comparación con las distancias sobre las cuales entrenaban. A pesar de su frecuente aparición, no existe suficiente información científica sobre rabdomiólisis en caballos de raid. Recientemente, Wilberger et al. (2015) midieron los valores de CK, como indicador de mionecrosis en 151 caballos de raid y encontraron que un 4% de los caballos terminaron el raid con valores de CK superiores a los esperados en respuesta al ejercicio de duración prolongada. Sin embargo, solo varios animales desarrollaron síntomas clínicos compatibles con rabdomiólisis. McKenzie et al. (2016) compararon la respuesta metabólica al ejercicio y las características musculares en caballos árabes de raid divididos en dos grupos, con rabdomiólisis y grupo control. No hallaron diferencias entre ambos grupos en cuanto a la respuesta al test de ejercicio. Por otro lado, los caballos del grupo rabdomiólisis, tuvieron características musculares compatibles con mionecrosis (núcleos más internos en las fibras maduras, mayor número de agregados citoplasmáticos de glucógeno y mayor índice de miopatía) en comparación con el grupo control, reflejando miopatía crónica. Lo interesante de este estudio es que, no se encontraron evidencias de miopatías metabólicas o enfermedades musculares por almacenamiento del glucógeno como sí se ha descrito para otras razas (Isgren et al., 2010; McCue et al., 2010; Naylor et al., 2012; Maile et al., 2017). Por tanto, si un caballo de raid experimenta una rabdomiólisis durante una competición y/o sesión de entrenamiento, en principio, habría que evaluar la intensidad de dicho ejercicio y la presencia de otros factores que podrían determinar dicho proceso, más que pensar en una enfermedad metabólica muscular subyacente.

Partiendo de la base de que las rabdomiólisis del caballo de raid se pueden producir por sobreesfuerzo, hipertermia, fatiga... no se justifica que los caballos del presente estudio, padecieran este proceso tras recorrer distancias tan cortas, particularmente cuando

se comparan con las distancias para las cuales se encontraban entrenados y en las que habían competido previamente de forma adecuada. Por este motivo, podrían proponerse varias hipótesis fisiopatológicas para justificar la aparición de rabdomiólisis en los casos descritos. En primer lugar, se ha sugerido que *Theileria equi* induce una lesión neuromuscular directa, con un incremento de las actividades plasmáticas/séricas de CK, AST y LDH (Hailat et al., 1997; Camacho et al., 2005). De hecho, se ha sugerido que, de forma individual, algún caballo podría estar en riesgo de rabdomiólisis si existe un daño muscular subclínico, que no se detecta y el animal se ve sometido a ejercicio (Wilberger et al., 2015), y esto podría haber ocurrido en estos casos. Una segunda hipótesis sería la influencia de la anemia secundaria a la infección por *Theileria equi*. Podría suponerse que, la anemia limitaría el aporte de oxígeno hacia el músculo en contracción, haciéndole más susceptible a experimentar daño muscular.

Diana et al. (2007) describieron un caso de un caballo con depresión, anorexia, fiebre, ictericia y orina oscura, que fue positivo a *Theileria equi*. Este animal, además, presentó complejos prematuros ventriculares polimórficos y taquicardia, asociada a un incremento de las concentraciones de troponina miocárdica I y CK de origen miocárdico. Estos autores consideraron que la lesión miocárdica fue secundaria a la hipoxia, daño endotelial y coagulación intravascular diseminada (CID), procesos que se han descrito en la patogénesis de la piroplasmosis equina (Van Amstel et al., 1987; Hanafusa et al., 1998; Wise et al., 2013; 2014). En nuestro caso, al tratarse de caballos en competición y posteriormente, casos llevados por el veterinario de cada uno de los animales, no se evaluó la posible existencia de arritmias cardíacas, ni de daño miocárdico, por lo que no se puede descartar su existencia. Por otro lado, estas hipótesis etiopatogénicas propuestas por Diana et al. (2007), pueden ser extrapoladas al daño muscular esquelético en nuestro estudio.

La sintomatología mostrada fue compatible con la esperada de rabdomiólisis en un caballo de raid, consistente en incapacidad para seguir el ejercicio, reducción brusca de la velocidad... (Wilberger et al., 2015). La presencia de orina oscura debido a la mioglobulinuria también fue un hallazgo común en la presente investigación (casos 1 y 2). Consideramos que el color oscuro de la orina estuvo ligado a la mioglobulinuria, ya que, en

el momento en el que se observó, no había una anemia evidente, que pudiera sugerir una hemoglobinuria. No obstante, no se puede descartar una mioglobinuria con una muy ligera intervención de hemoglobinuria. De hecho, en el caso 1, los valores de BIL total estaban por encima del rango de referencia, indicando anemia hemolítica.

En todos los casos, el diagnóstico se realizó en base a la sintomatología (rigidez muscular, dificultad para moverse, dolor fundamentalmente en la zona glútea) y elevación de las actividades de la enzima CK. La elevación de esta enzima en sangre/plasma/suero se considera un reflejo de necrosis muscular, generalmente se produce de una forma rápida tras una lesión, con una actividad pico o máxima a unas 4-6 h tras el ejercicio (Muñoz et al., 2006; 2010; Trigo et al., 2010; Wilberger et al., 2015).

En los tres casos, las actividades enzimáticas en plasma se normalizaron a los 2 meses de recuperación. Debido a que las analíticas fueron realizadas en base a los criterios clínicos de los veterinarios de cada uno de los caballos, no se pudo cuantificar la intensidad del daño muscular. También hay que tener en cuenta que la administración de dipropionato de imidocarb conlleva a daño muscular localizado, con liberación de las enzimas CK y AST hacia la circulación (Meyer et al., 2005; Grause et al., 2013; Wise et al., 2013; 2014), de modo que las medidas de estas enzimas durante el tratamiento no ayudaría a determinar si se produjo o no una recuperación de la rabdomiólisis.

La anemia fue de intensidad leve y tan solo se apreció en la primera analítica del caso 1. En ninguno de los tres casos, la anemia fue evidente clínicamente en el examen antes de las competiciones. Hay que tener en cuenta que el entrenamiento para resistencia conlleva a una expansión de la volemia, debido a la intervención de mecanismos asociados con la retención de agua y Na a nivel renal y gastrointestinal, fundamentalmente en el colon. Esta adaptación, concretamente se produce por la activación del eje renina-angiotensina-aldosterona (McKeever et al., 2002; Robert et al., 2010). Por esta razón, generalmente los caballos de raid en reposo suelen tener HTO inferiores a otros tipos de caballos (Robert et al., 2010; Trigo et al., 2010). Esta adaptación al entrenamiento hace que la detección clínica de la anemia sea más complicada.

La anemia, aunque no se detectó clínicamente, sí se diagnosticó mediante un examen hematológico. Desafortunadamente, los análisis hematológicos no se realizan de forma habitual en los caballos de raid antes de la competición, quedando restringidos a animales eliminados por patologías metabólicas, extenuación y deshidratación, al ser tratados medicamente y aún así, no se realiza en todos los casos (Castejón et al., 2006; Muñoz et al., 2006; 2010; Trigo et al., 2010). El examen hematológico previo a la competición podría ayudar al diagnóstico de patologías subclínicas, que si bien no se manifiestan en el examen previo a la competición, pueden aparecer clínicamente durante la misma, debido al efecto del ejercicio prolongado y el estrés.

Nuestra investigación tiene algunos puntos comunes con la presentada por Hailat et al. (1997). Estos autores describieron tres casos de theileriosis (en aquel momento, *Babesia equi*), en un establo de caballos de polo (n=103), que demostraron un inicio súbito de incapacidad de movimiento tras un ejercicio intenso. Dos de los animales afectados fallecieron en un periodo de 12 h y la tercera yegua, presentaba depresión, debilidad y anorexia. Los síntomas más comunes fueron fiebre y hemoglobinuria. En los tres animales se observó en sangre la presencia de *Theileria equi*. Estos autores concluyeron que, el ejercicio intenso puede predisponer a la manifestación clínica de la enfermedad en animales portadores clínicos, y lo mismo, podría haber ocurrido en nuestro estudio.

Una posible hipótesis es que, el estrés del transporte y de la competición, sería el causante de la manifestación de la enfermedad en estos caballos de raid, que podrían haber sido portadores subclínicos y por tanto, la infección latente habría pasado desapercibida. Se sabe que el transporte (Schmidt et al., 2010; Fazio et al., 2016) y el ejercicio de resistencia (Jensen-Waern et al., 1999; Robson et al., 2003) son importantes factores inmunosupresores, condicionando una liberación incrementada de cortisol.

11.4. CONCLUSIONES

La presente investigación describe tres casos de caballos de raid que, tras ser encontrados aptos para competir, en el control veterinario inicial, experimentaron síntomas agudos de rhabdomiólisis al inicio de la competición. Posteriormente, desarrollaron anemia y un análisis PCR dio positivo a *Theileria equi*.

Esta descripción de tres casos clínicos permite **concluir** que, los caballos de deporte pueden ser portadores subclínicos de *Theileria equi*, y bajo condiciones estresantes, tales como transporte y competición, pueden desarrollar síntomas (sub)agudos de daño muscular o rhabdomiólisis. El daño muscular esquelético puede deberse bien a la acción directa del parásito, o ser secundario a otros procesos fisiopatológicos implicados en la theileriosis, tales como hipoxia celular (particularmente al mismo tiempo que el animal hace ejercicio), lesión endotelial, coagulación intravascular diseminada e incluso daño oxidativo.

11.5. RESUMEN

Caso clínico: Infección subclínica por *Theileria equi* y rabdomiólisis en tres caballos de resistencia

Introducción. Se sabe que el transporte y la competición son factores de estrés en caballos de deporte, conllevando, en algunos casos, a un estado de inmunosupresión. En zonas endémicas, como es España, algunos caballos pueden ser portadores subclínicos de *Theileria equi*, haciendo evidente clínicamente la infección en momentos de inmunosupresión y estrés. Previamente, se ha descrito que un ejercicio intenso (polo) puede dar lugar a lesiones musculares esqueléticas en caballos con *Theileria* e igualmente, se ha confirmado que este hemoparásito puede causar lesiones musculares miocárdicas, que cursan con arritmias cardíacas.

Objetivo. Describir tres casos clínicos, de caballos de raid, clínicamente sanos en la inspección veterinaria previa a la competición, pero que desarrollaron rabdomiólisis por ejercicio y fueron posteriormente positivos a *Theileria equi*.

Descripción de los casos. El caso 1 fue un caballo Pura Raza árabe, macho, entero, 6 años, que compitió en una prueba de 80 km, que experimentó rabdomiólisis clínica a los 7 km del inicio. Este animal tenía anemia, orina oscura, hiperbilirrubinemia y actividad creatín kinasa CK elevada (10,340 UI/l). También mostró valores elevados de bilirrubina y de urea. El caso 2 fue una yegua Angloárabe, de 12 años de edad, que en una prueba de 160 km, presentó síntomas de rabdomiólisis a los 18 km, con valores de CK de 11,320 UI/l. Dos días después de la competición, apareció con fiebre, ictericia, depresión y anorexia. El caso 3 era un caballo cruzado, de 7 años, macho castrado, que competía en una prueba de 120 km y mostró rabdomiólisis a los 21 km, con niveles de CK de 12,430 UI/l. La anemia se observó el día posterior a la competición. En los tres casos, los animales pasaron el control veterinario previo a la competición. La anemia solo fue evidente en el examen inicial en el caso 1. Una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue positiva

para *Theileria equi* y negativa para *Babesia caballi*. El tratamiento en los tres caballos consistió en dipropionato de imidocarb (4,0 mg/kg intramuscular, cada 72 h, 4 tratamientos). En el caso 1, además, se administró un suplemento oral de Fe y vitamina B12. En los casos 2 y 3, los veterinarios de dichos caballos adicionaron al tratamiento la administración intravenosa de oxitetraciclina (7,7 mg/kg, 1 vez/día, 7 días). Se repitieron las analíticas a los 1,5- 2 meses, y la anemia había desaparecido. En los casos 1 y 2, las actividades plasmáticas/séricas de la CK se habían normalizado, pero no en el caso 3, donde la enzima AST permanecía por encima del rango de referencia.

Conclusión y relevancia clínica. Los caballos de raid, y de deporte en general, bajo condiciones estresantes (transporte y competición) pueden desarrollar síntomas agudos de rabdomiólisis, junto con manifestaciones clínicas y/o laboratoriales de infección por *Theileria equi*. Queda por demostrar si estos caballos eran portadores crónicos previamente a la competición.

PALABRAS CLAVE. Caballos. Rabdomiólisis. Resistencia. *Theileria equi*.

11.6. SUMMARY

Clinical case: Subclinical infection by *Theileria equi* and rhabdomyolysis in three endurance horses

Background. It is well established that transportation and competitions are stressors in sport horses, leading to immune-suppression. In endemic areas, such as Spain, some horses might be subclinical carriers of *Theileria equi*, showing clinical signs in stressful periods. Previously, it has been described that an intense exercise (polo) might result in muscle damage in horses naturally infected by *Theileria equi*. Similarly, it has been reported that this hemoparasite might elicit myocardial injury and heart arrhythmias.

Objective. To describe three clinical cases of endurance horses, clinically healthy in the veterinary examination (vet-gate) previously to the competition, that underwent clinical signs of acute exertional rhabdomyolysis and after, they were found to be positive to *Theileria equi*.

Description of the cases. **Case 1:** Horse 1 was an Arabian stallion, 6-year-old that started an 80 km-race, presenting clinical rhabdomyolysis after covering 7 km. The horse had anemia, dark red urine, hyperbilirubinemia and increased creatin kinase (CK) activity (10340 IU/l). This horse also had increased values of total bilirubin and urea. **Case 2:** Angloarabian mare, 12-year-old, that started a 160 km-race, and had signs of rhabdomyolysis after 18 km, with increased plasma/serum CK activity (11320 IU/l). Two days later, she showed fever, icterus, depression and anorexia. **Case 3:** Crossbred gelding, 7-year-old, competing in a 120 km-race. He showed clinical signs of rhabdomyolysis after covering 21 km, with CK values of 12430 IU/l. Anemia was found the day later after competition. In the three cases, the animals were considered fit in the vet-gate previous to the competitions. Anemia was only clinically detected in this first vet-gate in case 1. In the three horses, diagnosis of *Theileria equi* infection was made by polymerase chain reaction (PCR) test and they were negative to *Babesia caballi* infection. Treatment in the three cases

consisted of intramuscular (IM) dipropionate of imidocarb (4.0 mg/kg IM, every 72 h, for 4 treatments). In case 1, an oral supplement containing iron and vitamins B were administered. In cases 2 and 3, the veterinarians in charge of these horses completed the treatment in intravenous oxitetracilin (7.7 mg/kg, once at day, for 7 days). Hematological and biochemical studies were repeated between 1.5 and 2 months after, and anemia disappeared in the three cases. In cases 1 and 2, serum/plasma CK activities were normalized, however, horse 3, still had raised serum/plasma aspartate aminotransferase (AST) activity.

Conclusion and clinical relevance. Sport horses in general, and endurance horses in particular, under stressful conditions, such as transportation and racing, might develop acute clinical signs of rhabdomyolysis, together with clinical and/or laboratorial manifestations of infection by *Theileria equi*. It would be of interest to demonstrate whether these horses were subclinical carriers before starting the competitions.

KEY WORDS. Endurance. Horses. Rhabdomyolysis. *Theileria equi*

11.7 BIBLIOGRAFÍA

- ADASZEK T, GARCÍA-BOCANEGRA I, ARENAS-MONTES A, CARBONERO A, ARENAS A, WINIARCZYK S. (2012). Identification of piroplasms isolated from asymptomatic equine species from southern Spain. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 125(11-12):509-512.
- ALANAZI AD, SAID AE, MORIN-ADELIN V, ALYOUSIF MS, SLAPETA J. (2014) Quantitative PCR detection of *Theileria equi* using laboratory workflows to detect asymptomatic persistently infected horses. *Vet Parasitol.* 206(3-4):138-145.
- 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* horses in western Mexico by nested PCR. *Parasitol In.* 66(1):821-824.
- BARTOLOMÉ DEL PINO LE, NARDINI R, VENEZIANO V. (2016) *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in central-Southern Italy: sero-molecular survey and associated risk factors. *Ticks Tick Borne Dis.* 7(3):462-469.
- CAMACHO AT, GUITIAN FJ, PALLAS E, GESTAL JJ, OLMEDA AS, HABELA MA. (2005). *Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain. *Trop Anim Health Prod.* 37:293-302.
- CASTEJÓN F, TRIGO P, MUÑOZ A, RIBER C. (2006). Uric acid responses to endurance racing and relationships with performance, plasma biochemistry and metabolic alterations. *Equine Vet J.* 36:70-73.
- DAVITKOV D, VUCICEVIC M, STEVANOVIĆ J, KRSTIĆ V, SLIJEPCEVIC D, GLAVINIĆ U, STANIMIROVIĆ Z. (2016). Molecular detection and prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses of central Balkan. *Acta Parasitol.* 61(2):337-342.
- DE WAAL T. (2012). Advances in diagnosis of protozoan diseases. *Vet Parasitol.* 189:65-74.
- DIANA A, GUGLIELMINI C, CANDINI D, PIETRA M, CIPONE M. (2007). Cardiac arrhythmias associated with piroplasmosis in the horse: a case report. *Vet J.* 174(1):193-195.
- FAZIO E, MEDICA P, CRAVANA C, FERLAZZO AA. (2016). Pituitary-adrenocortical adjustments to transport stress in horses with previous different handling and transport conditions. *Vet World.* 9(8):856-861.
- FERREIRA EP, VIDOTTO O, ALMEIDA JC, RIBEIRO LP, BORGES MV, PEQUENO WH, STIPP DT, DE OLIVEIRA CJ, BIONDO AW, VIEIRA TS, VIEIRA RF. (2016). Serological and

molecular detection of *Theileria equi* in sport horses of northeastern Brazil. *Inmunol Microbiol.* 47:72-76.

FRIEDHOFF KT, TENTER AM, MULLER I. (1990) Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. *Rev Sci.* 9:1187-1194.

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(2):172-178.

GRAUSE JF, UETI MW, NELSON JT, KNOWLES DP, KAPPMAYER LS, BUNN TO. (2013). Efficacy of imidocarb dipropionate in eliminating *Theileria equi* from experimentally infected horses. *Vet J.* 196:541-546.

GUIDI G, PRADIER S, LEBERT I, LEBLOND A. (2015). Piroplasmosis in an endemic area: analysis of the risk factors and their implications in the control of theileriosis and babesiosis in horses. *Parasitol Res.* 114(1):71-83.

HAILAT NQ, LAFI SQ, AL-DARRAJI AM, AL-ANI FK. (1997). Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. *Vet Parasitol.* 69:1-8.

HANAFUSA Y, CHO KO, KANEMARU T, WADA R, SUGIMOTO C, ONUMA M. (1998). Pathogenesis of *Babesia caballi* infection in

experimental horses. *J Vet Med Sci.* 60(10):1127-1132.

HINES SA, RAMSAY JD, KAPPMAYER LS, LAU AO, OJO KK, VAN VOORHIS WC, KNOWLES DP, MEALEY RH. (2015). *Theileria equi* isolates vary in susceptibility to imidocarb dipropionate but demonstrate uniform in vitro susceptibility to a bumped kinase inhibitor. *Parasit Vectors.* 8:33.

ISGREN CM, UPJOHN MM, FERNANDEZ-FUENTE M, MASSEY C, POLLOTT G, VERHEYEN KL, PIERCY RJ. (2010). Epidemiology of exertional rhabdomyolysis susceptibility in standardbred horses reveals associated risk factors and underlying enhanced performance. *PLoS One.* 14;5(7):e11594.

JENSEN-WAERN M, LINDBERG A, JOHANNISSON A, GRÖNDAHL G, LINDGREN JA, ESSÉN-GUSTAVSSON B. (1999). The effects of an endurance ride on metabolism and neutrophil function. *Equine Vet J.* 30:605-609.

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. *Vet Parasitol.* 169(3-4):273-278.

KUMAR S, RAKHA NK, GOYAL L, GOEL P, KUMAR R, KUMAR A, KUMAR S. (2015). Diagnostic application of recombinant equine merozoite surface antigen-1 in elisa for detection

- of *Theileria equi* specific antibodies. Jpn J Vet Res. 63(3):129-137.
- LAUS F, SPATERNA A, FAILLACE V, VERONESI F, RAVAGNAN S, BERIBÉ F, CERQUETELLA M, MELIGRANA M, TESEI B. (2015). Clinical investigation in *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Italian donkeys. BMC Vet Res. 11:100. Doi:10.1186/s12917-015-0411-7
- LIU Q, MELI ML, ZHANG Y, MEILI T, STIRN M, RIOND B, WEIBEL B, HOFMANN-LEHMANN R. (2016). Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene in *Theileria equi* from horses presented in Switzerland. Vet Parasitol. 221:24-29.
- MAILE CA, HINGST JR, MAHALINGAN KK, O'REILLY AO, CLEASBY ME, MICKELSON JR, MCCUE ME, ANDERSON SM, HURLEY TD, WOJTASZEWSKI JF, PIERCY RJ. (2017). A highly prevalent equine glycogen storage disease is explained by constitutive activation of a mutant glycogen synthase. Biochim Biophys Acta. 1861(1 Pt A):3388-3398.
- MCCUE ME, ANDERSON SM, VALBERG SJ, PIERCY RJ, BARAKZAI SZ, BINNS MM, DISTL O, PENEDO MC, WAGNER ML, MICKELSON JR. (2010). Estimated prevalence of the type 1 polysaccharide storage myopathy mutation in selected North American and European breeds. Anim Genet. 41(Suppl 2):145-149.
- MCKEEVER KH, SCALI R, GEISER S, KEARNS CF. (2002). Plasma aldosterone concentration and renal sodium excretion are altered during the first days of training. Equine Vet J. 34:524-531.
- MCKENZIE EC, EYRICH LV, PAYTON ME, VALBERG SJ. (2016). Clinical, histopathological and metabolic responses following exercise in Arabian horses with a history of exertional rhabdomyolysis. Vet J. 216:196-201.
- MEHLHORN H, SCHEIN E. (1998). Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein. Parasitol Res. 84:467-475.
- MEYER C, GUTHRIE AJ, STEVENS KB. (2005). Clinical and clinicopathological changes in 6 healthy ponies following intramuscular administration of multiple doses of imidocarb dipropionate. J S Afr Vet Assoc. 76(1):26-32
- MUÑOZ A, CUESTA I, RIBER C, GATA J, TRIGO P, CASTEJÓN FM. (2006). Trot asymmetry in relation to physical performance and metabolism in equine endurance rides. Equine Vet J. 36:50-54.
- MUÑOZ A, RIBER C, TRIGO P, CASTEJÓN-RIBER C, CASTEJÓN FM. (2010). Dehydration, electrolyte imbalances and renin-angiotensin-aldosterone-vasopressin axis in successful and unsuccessful endurance horses. Equine Vet J. 42(38):83-90.
- NAYLOR RJ, LIVESEY L, SCHUMACHER J, HENKE N, MASSEY C, BROCK KV, FERNANDEZ-FUENTE M, PIERCY RJ. (2012). Allele copy number and underlying pathology are

associated with subclinical severity in equine type 1 polysaccharide storage myopathy (PSSM1). PLoS One. 7(7):e42317.

OLADOSU LA, OLUFEMI BE. (1992). Haematology of experimental babesiosis and ehrlichiosis in steroid immunosuppressed horses. Zentralbl Veterinarmed B. 39(5):345-352.

OMAR MA, SALAMA A, ELSIFY A, RIZK MA, AL-ABOODY MS, ABOULAILA M, EL-SAYED SA, IGARASHI I. (2016). Evaluation of in vitro inhibitory effect of enoxacin on *Babesia* and *Theileria* parasites. Exp Parasitol. 161:62-67.

PIANTEDOSI D, D'ALESSIO N, DI LORIA A, DI PRISCO F, MARIANI U, NEOLA B, SANTORO M, MONTAGNARO S, CAPELLI G, VENEZIANO V. (2014). Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in donkeys from Southern Italy. Vet J. 202(3):578-582.

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. Parasitol Res. 112(7):2611-2617.

ROBERT C, GOACHET AG, FRAIPONT A, VOTION DM, VAN ERCK E, LECLERC JL. (2010). Hydration and electrolyte balance in horses during an endurance season. Equine Vet J. 38:98-104.

ROBSON PJ, ALSTON TD, MYBURGH KH. (2003). Prolonged suppression of the innate

immune system in the horse following an 80 km endurance race. Equine Vet J. 35:133-137.

ROTHSCHILD CM. (2013). Equine piroplasmosis. J Equine Vet Sci. 3:497-508.

SCHMIDT A, HÖDL S, MÖSTL E, AURICH J, MÜLLER J, AURICH C. (2010). Cortisol release, heart rate, and heart rate variability in transport-naïve horses during repeated road transport. Domest Anim Endocrinol. 39(3):205-213.

SUMBRIA D, DAS SINGLA L, SHARMA A. (2016). *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection of equids in Punjab, India: a serological and molecular survey. Trop Animal Health Prod. 48(1):45-52.

TRIGO P, CASTEJON F, RIBER C, MUÑOZ A. (2010). Use of biochemical parameters to predict metabolic elimination in endurance rides. Equine Vet J. 38:142-146.

VAN AMSTEL SR, OLIVIER GC, REYERS F. (1987). Disseminated intravascular coagulation in the horse: a report of six cases. J S Afr Vet Assoc. 58(3):109-112.

WILBERGER MS, MCKENZIE EC, PAYTON ME, RIGAS JD, VALBERG SJ. (2015). Prevalence of exertional rhabdomyolysis in endurance horses in the Pacific Northwestern United States. Equine Vet J. 47(2):165-170.

WISE LN, KAPPMAYER LS, MEALEY RH, KNOWLES DP. (2013). Review of equine piroplasmosis. J Vet Intern Med. 27:1334-1346.

WISE LN, PETZEL-MCCLUSKWY AM, MEALEY RH, KNOWLES DP. (2014). Equine piroplasmosis. Vet Clin North Am: Equine Pract. 30(3):677-693.

ZANET S, BASSANO M, TRISCIUOGGIO A, TARICCO I, FERROGLIO E. (2017). Horses infected by Piroplasms different from *Babesia caballi* and *Theileria equi*: species identification

and risk factors analysis in Italy. Vet Parasitol. 236:38-41.

ZOBBA R, ARDU M, NICCOLINI S. (2008). Clinical and laboratory findings in equine piroplasmosis. J Equine Vet Sci. 28:301-308.



12. Conclusiones Generales

La presente investigación, centrada en caballos infectados de forma natural por *Theileria equi* y dividida en tres estudios, ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

Primera. La sintomatología mostrada por los animales, tanto en los caballos provenientes de la yeguada estudiada, como según la información remitida por diversos veterinarios de Andalucía, suele ser de intensidad leve a moderada, compatible con un estado de portador crónico subclínico y posterior reagudización.

Segunda. Los casos clínicos se produjeron entre los meses de marzo a octubre, con un pico en los meses de junio a julio, momento del año con una climatología que favorece el desarrollo de las garrapatas vectoriales. Esto nos lleva a pensar que se trataría de reinfecciones, posiblemente asociadas al estado de premunidad del hospedador, a ser España una zona endémica de theileriosis equina.

Tercera. Los síntomas y alteraciones laboratoriales, dentro de su baja a moderada intensidad baja a moderada, fueron más evidentes en yeguas en pastoreo que en machos en estabulación. Por el contrario, según describieron los veterinarios de Andalucía, la incidencia de la sintomatología también es muy alta en animales en estabulación, a pesar de hacer controles químicos contra el vector. Por tanto, el control de garrapatas en el box, si bien reduce el riesgo de contacto con el vector, no descarta completamente el riesgo de padecer sintomatología asociada al parásito.

Cuarta. Los síntomas clínicos más evidentes fueron inespecíficos (como fiebre, depresión, anorexia, fatiga y pérdida de rendimiento) y anemia hemolítica, con incremento de bilirrubina. Esta hiperbilirrubinemia no pareció estar asociada a disfunción y/o lesión hepática, ya que los analitos hepáticos no se alteraron de forma significativa. El síntoma clínico que más alarmó a los propietarios fue el dolor cólico.

Quinta. Si bien algunos animales mostraron alteraciones laboratoriales de la coagulación sanguínea, afectando tanto a la coagulación primaria, con trombocitopenia, como a la secundaria, con un incremento de tiempo de protrombina, estas alteraciones se reflejaron clínicamente en petequias en un número muy reducido de animales.

Sexta. La infección por *Theileria equi* parece dar lugar a una respuesta inflamatoria en el caballo, de una gran variabilidad individual, mostrando algunos animales, incrementos muy significativos de las concentraciones de proteínas de fase aguda, amiloide sérico A, proteína C reactiva, haptoglobina y fibrógeno, junto con niveles muy bajos de otros marcadores de inflamación, como el hierro sérico.

Séptima. Los caballos sometidos a factores estresantes, como puede ser un entrenamiento intenso, transporte o competición, pueden desarrollar síntomas agudos de rabdomiólisis durante el ejercicio, mostrando anemia con posterioridad. El daño muscular podría ser una consecuencia directa de la lesión del parásito en el tejido muscular o bien una manifestación clínica de hipoxia durante el ejercicio, de forma secundaria a la anemia.



13. Resumen General

Caracterización clínica y laboratorial, incluyendo proteínas de fase aguda en caballos positivos a *Theileria equi*

Introducción. La theileriosis equina es una enfermedad transmitida por garrapatas y causada por el protozoo Apicomplexa intraeritrocitario, *Theileria equi*. Es un parásito muy común en zonas templadas, con una seroprevalencia elevada en Andalucía. No se conoce si este parásito, al igual que otros hemoprotozoos (*Babesia canis* en perros y *Theileria annulata* en vacuno) induce una respuesta de fase aguda en el caballo infectado. El conocimiento de las características de los animales infectados y de su manejo, es esencial para el controlar o limitar el proceso.

Objetivos. 1) Descripción clínica y laboratorial de la infección por *Theileria equi* en caballos Pura Raza Española (PRE), pertenecientes a una misma yeguada, evaluando si existen diferencias entre animales estabulados y en pastoreo y valorando la posible respuesta inflamatoria causada por el parásito; 2) Descripción de los casos clínicos que suelen encontrarse en la clínica de campo, siendo por tanto, consultas demandadas por los propietarios, analizando las características de los animales infectados, sus condiciones de manejo y climatología y el procedimiento diagnóstico-terapéutico seguido por el clínico; 3) Descripción de tres casos clínicos de caballos sanos, que desarrollaron en competición síntomas de lesión muscular aguda y que, posteriormente se halló que fueron positivos a *Theileria equi*.

Hipótesis a comprobar. Que se afectarán con mayor frecuencia, y que los síntomas, alteraciones laboratoriales y respuesta aguda a la inflamación serán más evidentes en los animales jóvenes y/o geriátricos, en animales en pastoreo y cuando las condiciones climatológicas favorezcan la presencia del vector.

Material y métodos. Estudio I. Se han estudiado 33 caballos PRE, pertenecientes a la misma ganadería y divididos en cuatro grupos, yeguas en pastoreo, positivas a *Theileria equi* (grupo T-A; n=16), machos enteros estabulados, positivos a *Theileria equi* (grupo T-

B; n=7), hembras en pastoreo sin infección (n=5) y machos estabulados sin infección (n=5). No encontraron diferencias laboratoriales entre estos dos últimos grupos, machos y hembras, por lo que se integraron en un único grupo (grupo control C; n=10). Se realizó un examen físico completo y se tomó una muestra de sangre antes del tratamiento, para evaluar parámetros hematológicos, bioquímicos, hemostáticos, proteínas de fase aguda y marcadores de inflamación. Estudio II. Se hizo un estudio basado en cuestionarios, referentes a caballos cuyos propietarios habían requerido ayuda veterinaria. Estos cuestionarios fueron enviados por correo electrónico a veterinarios de las provincias de Córdoba, Sevilla, Huelva, Cádiz y Jaén. Los cuestionarios fueron individuales para cada paciente y se recopiló información relativa a las características del caballo, manejo y condiciones ambientales, clínica presentada, modalidades diagnósticas y procedimiento terapéutico, y evolución de los casos. Estudio III. Se introdujeron tres caballos de raid (1º, caballo Árabe, macho, entero, 6 años; 2º, yegua Angloárabe, 12 años; 3º, caballo cruzado, 7 años), sanos, considerados aptos para competir, según el examen veterinario previo y que desarrollaron rabdomiólisis al inicio de la competición.

Resultados. Estudio I. Los síntomas más comunes fueron, en el grupo T-A, anorexia o cambios de apetito, anemia, ictericia y depresión y en el grupo T-B, reducción del rendimiento y depresión. En comparación con el grupo C, el grupo T-A mostró valores superiores de frecuencia respiratoria, índices eritrocitarios volumétricos, bilirrubina total, fósforo, tiempo de protrombina, proteína C reactiva y capacidad de unión al hierro no saturado, e inferiores del número de glóbulos rojos, hemoglobina, valor hematócrito y número de plaquetas. También en comparación con el grupo C, el grupo T-B presentó valores superiores de frecuencia respiratoria, número de linfocitos, creatinina y lactato deshidrogenasa e inferiores de valor hematócrito y plaquetas. Se ha encontrado una gran variabilidad individual en la respuesta de fase aguda. Tres yeguas del grupo T-A experimentaron una respuesta inflamatoria significativa, con concentraciones altas de amiloide sérico A, proteína C reactiva, haptoglobina y fibrinógeno y muy bajas de hierro sérico. Estudio II. Se consiguieron un total de 37 cuestionarios rellenados de forma completa por los veterinarios clínicos. Los porcentajes de manifestación clínica más elevados correspondieron a caballos PRE, machos enteros, con edades comprendidas entre

los 6 y 10 años, usados para paseos y actividad deportiva. Hubo una respuesta más intensa por parte de los veterinarios de la provincia de Sevilla. La mayoría de los casos se produjeron durante los meses de mayo y julio, y un porcentaje elevado estaba en estabulación, con control químico de la población de garrapatas. El motivo más común de llamada del propietario fue cólico, si bien los síntomas encontrados más frecuentemente por los veterinarios fueron inapetencia, pérdida de rendimiento, fiebre, depresión, mucosas pálidas e ictericia. El método completario laboratorial más utilizado fue el examen hematológico. Se confirmó el diagnóstico, fundamentalmente mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguida de inmunofluorescencia indirecta. Los fármacos administrados más comúnmente fueron el dipropionato de imidocarb y la buparvaquona. Casi todos los animales necesitaron un tratamiento de soporte, fundamentalmente suplementos vitamínicos y de hierro, siendo raras las transfusiones de sangre. La duración media del tratamiento fue de 1 a 4 semanas y la evolución del proceso fue, en general, favorable (con la excepción de un caballo). Estudio III. El caballo 1º mostró rabdomiólisis a los 7 km de empezar la competición, anemia, orina oscura, hiperbilirrubinemia e incremento de CK. La yegua 2º experimentó rabdomiólisis a los 18 km de iniciar la prueba. Dos días después apareció con fiebre, ictericia, depresión y anorexia. El caballo 3º mostró rabdomiólisis a los 21 km, observándose la anemia el día posterior a la competición. En los tres casos, la prueba PCR fue positiva a *Theileria equi* y negativa a *Babesia caballi*.

Conclusiones y relevancia clínica. A pesar de tratarse Andalucía de una zona endémica, la mayoría de los casos clínicos se produjeron durante los meses en los que se encuentra en el medio ambiente el vector de *Theileria*, lo cual sugiere reinfecciones agudas, sin descartar un estado de portador crónico. En general, la sintomatología fue de intensidad leve a moderada, los cambios laboratoriales reflejaron fundamentalmente anemia de tipo hemolítico, y algunos animales mostraron una respuesta inflamatoria, con elevación de las proteínas de fase aguda. Por otro lado, hay que tener un especial cuidado en animales sometidos a situaciones estresantes (entrenamiento, competición y transporte), que pueden comprometer a la respuesta inmune, dando lugar a manifestaciones clínicas agudas.

PALABRAS CLAVE. Anemia. Caballos. Diagnóstico. Proteínas de fase aguda. *Theileria equi*. Tratamiento.



14. Main Summary

Clinical and laboratorial characterization, including acute phase proteins, in horses naturally positive a *Theileria equi*

Introduction. Equine theileriosis is a tick-borne disease of Equidae caused by the intraerythrocytic Apicomplexa protozoa, *Theileria equi*. This parasite is very common in template areas, with a high prevalence in Andalucía. It is unknown whether this parasite elicits an acute inflammatory response in the horse, as reported for hemoprotozoans in other species (*Babesia canis* in dogs and *Theileria annulata* in cows). Knowledge of the characteristics of the infected animals, as well as the management of the disease is pivotal in order to control or limit this infection.

Objectives. 1) To perform a clinical and laboratorial description of the infection by *Theileria equi* in Spanishbred horses, from the same farm, evaluating differences between stabled animals and those at pasture, and the putative acute phase reaction caused by the parasite; 2) To describe clinical cases that ambulatory clinicians find in Andalucía, assessing the characteristics of the animals, management and climatic conditions, and the diagnostic and therapeutic protocols followed by the equine practitioners; 3) To describe three clinical cases of healthy horses that developed an acute rhabdomyolysis during exercise and after, it was found that these animals were positive to *Theileria equi*.

Hypotheses to test. The younger and/or geriatric animals, the horses at pasture and under climatic conditions favorable to the vector, would be associated with more intense clinical signs, laboratorial alterations and acute phase response.

Material and methods. Study I. Thirty-three Spanish horses were studied, from the same farm, and divided into four groups: mares at pasture, positive to *Theileria equi* (group T-A; n=16), stallions stabled, positive to *Theileria equi* (group T-B; n=7), mares at pasture, free of infection (n=5) and stallions stabled, also free of this parasite (n=5). Because laboratorial differences were not found between these last two groups, all the data were processed together (control group, group C; n=10). Animals were subjected to a clinical

physical examination and a blood sample was extracted, always before treatment, in order to measure hematological and serum biochemical parameters, coagulation profile, acute phase proteins and other markers of inflammation. Study II. This study was undertaken using a questionnaire-based design. The questionnaires were sent to equine clinicians of Córdoba, Sevilla, Huelva, Cádiz and Jaén, concerning their clinical cases. Veterinarians were asked to fill a questionnaire for each patient, regarding individual characteristics of each horse, management and environmental conditions, clinical signs, and diagnostic and therapeutic protocols, and evolution of the cases. Study III. Three endurance horses were included in this study (Horse 1, Arabian stallion, 6 year-old; Horse 2, Angloarabian mare, 12 years; Horse 3, crossbred horse, 7 years), healthy and considered fit to compete in the vet-gate previous to the race. The three horses developed acute rhabdomyolysis at the onset of the competition.

Results. Study I. The most common clinical signs in the group T-A were anorexia or changes in appetite, anemia, icterus and depression; and in the group T-B, reduction in performance and depression. Compared with the group C, mares of group T-A had higher values of respiratory rate, volumetric erythrocytic indices, bilirubin, phosphorus, prothrombine time, C reactive protein and unsaturated iron binding capacity and lower values of red blood cell number, hemoglobin concentrations, hematocrit and platelet number. Also compared to group C, the animals of group T-B showed higher respiratory rate, number of lymphocytes, creatin and lactate dehydrogenase and lower hematocrit and number of platelets. A marked individual variability was found in the intensity of the acute response to the parasite. Three mares of the group T-A exhibited the greater inflammatory response, with high concentrations of serum amyloid A, C reactive protein, haptoglobin and fibrinogen and low concentrations of serum iron. Study II. A total of 37 questionnaires were sent back fulfilled by the equine clinicians. The most common patient with clinical theileriosis was the Spanishbred stallions, aged between 6 and 10 years, used for leisure and sport activities. Most of the questionnaires were completed by the veterinarians of Sevilla. Most of the clinical cases appeared during the months of May and July, and in a high percentage in stabled horses, subjected to chemical control of tick population. The main complaint of the owners was colic. The most common clinical signs found by the

clinicians, however, were inappetence, loss of performance, fever, depression, pale mucous membranes and icterus. Hematology was the most used complementary method. Confirmation of the diagnosis was made, mainly, by polymerase chain reaction (PCR) and secondly, by indirect immunofluorescent. Treatment mainly consisted in imidocarb propionate and buparvaquone. Most of the animals required a palliative treatment, consisting in vitamin supplements and iron. Blood transfusions were not frequently needed. The mean duration of the treatment was between 1 and 4 weeks and in main lines, the evolution of the disease was good (with the exception of one horse). Study III. Horse 1 showed rhabdomyolysis after 7 km of racing. He also presented anemia, dark red urine, hyperbilirubinemia and raised CK activity. Horse 2 underwent rhabdomyolysis after covering 18 km. Two days later, this mare had fever, icterus, depression and anorexia. Horse 3 exhibited rhabdomyolysis after 21 km of racing, and the anemia was clinically found the day after. The three cases showed a positive result for *Theileria equi* and negative result for *Babesia caballi* with PCR technique.

Conclusions and clinical relevance. Despite Andalucía is an endemic area, most of the clinical cases appeared during the months with better environmental conditions for the development of the vector of *Theileria equi* (ticks), suggesting acute (re)infections, although the hypothesis of a chronic carrier status cannot be rejected. In main lines, the severity of the infection was mild to moderate; laboratorial changes indicated hemolytic anemia and some animals showed an acute inflammatory response, with increased concentrations of acute phase proteins. On the other hand, a special care is necessary with horses subjected to stressful situations, such as training, competition and transportation, which might dampen the immune response of the animal, leading to acute clinical signs.

KEY WORDS. Acute phase proteins. Anemia. Diagnosis. Horses. *Theileria equi*. Treatment.



15. Artículos Derivados de la Tesis (INDICIOS DE CALIDAD)

MUÑOZ A, RODRÍGUEZ RGM, RIBER C, TRIGO P, GÓMEZ-DÍEZ M, CASTEJÓN FM (2012). Subclinical *Theileria equi* infection and rhabdomyolysis in three endurance horses. *Pakistan Veterinary Journal*, 33(2): 256-258.

(Índice de impacto; 1,365; Posición que ocupa la revista en la categoría: 42/142; Tercil T1; Base de datos: ISI Web of Knowledge; Categoría: Veterinary Sciences. Año: 2012)

RODRÍGUEZ RGM, CERÓN JJ, RIBER C, CASTEJÓN F, GÓMEZ-DÍEZ M, SERRANO-RODRÍGUEZ JM, MUÑOZ A (2014). Acute phase proteins in Andalusian horses infected with *Theileria equi*. *The Veterinary Journal*, 202: 182-183.

(Índice de impacto; 2,165; Posición que ocupa la revista en la categoría: 11/142; Tercil T1; Base de datos: ISI Web of Knowledge; Categoría: Veterinary Sciences. Año: 2013)