

PREMIO FIDEL PAGÉS MIRAVÉ 2010

Cría Caballar de las Fuerzas Armadas como Observatorio Epidemiológico de Enfermedades Equinas de Declaración Obligatoria: Diagnóstico Molecular y análisis de la prevalencia de la Piroplasmosis Equina causada por *Theileria equi*

Vega Pla JL.¹

Sanid. mil. 2010; 66 (3): 146-153; ISSN: 1887-8571

RESUMEN

Antecedentes y Objetivos: El Organismo Autónomo Cría Caballar de las Fuerzas Armadas dispone de personal, infraestructuras y un plantel de caballos y asnos que se despliegan en Paradas de Sementales del Estado que lo sitúan en una posición de privilegio para la investigación y estudio de enfermedades equinas a nivel nacional. La *Theileria equi* es uno de los agentes etiológicos de la Piroplasmosis Equina y tiene una relevancia especial por su enorme seroprevalencia a nivel mundial y por la resistencia a los tratamientos con los quimioterápicos actuales. En este estudio se pretende determinar la correlación entre individuos seropositivos y portadores asintomáticos en la cabaña de Cría Caballar de las Fuerzas Armadas. **Material y Métodos:** Se tipifican muestras de caballos de Cría Caballar de las Fuerzas Armadas, con la técnica de enzimoimmunoensayo de inhibición competitiva (cELISA) para detectar anticuerpos y con técnica de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR) para detectar el parásito en sangre. **Resultados:** Hay una elevada correlación y concordancia entre la técnica molecular empleada y el enzimoimmunoensayo de inhibición competitiva. Se observa que un porcentaje alto de potros (19%) adquieren el parásito en edades muy tempranas (menos de 40 días). **Conclusiones:** Los caballos seropositivos han de considerarse como portadores asintomáticos. Se determina que la tasa de portadores asintomáticos *Theileria equi* en Cría Caballar (64,45%) es equivalente a la tasa de seroprevalencia publicada para el resto del territorio nacional. Finalmente, no se descarta una posible vía de transmisión vertical de *Theileria equi* de la yegua al potro durante la gestación.

PALABRAS CLAVE: *Theileria equi*, Diagnóstico molecular, Équidos.

Horse breeding in the Armed Forces as an epidemiological observatory of reportable equine diseases: molecular diagnosis and analysis of the prevalence of Equine Piroplasmosis caused by *Theileria equi*.

SUMMARY

Background and objectives: The «Organismo Autónomo Cría Caballar de las Fuerzas Armadas» provides personnel, infrastructure and a number of horses and donkeys that are deployed across the country, that places it in a privileged position for research and study of equine diseases nationwide. The *Theileria equi* is one of the etiologic agents of Equine Piroplasmosis and has a special relevance for its huge global seroprevalence and resistance to treatment with current chemotherapeutic agents. This study aims to determine the correlation between serum-positive individuals and asymptomatic carriers in the scope of horse breeding into the Armed Forces. **Material and Methods:** Samples obtained from horses belonging to Armed Forces were typed with the technique of competitive inhibition enzyme immunoassay (cELISA) to detect serum antibodies and with the real-time polymerase chain reaction technique (RT-PCR) to detect the parasite in blood. **Results:** There was a high correlation and agreement between the molecular technique used and the competitive inhibition enzyme immunoassay. It is noted that a high percentage of foals (19%) acquire the parasite at very early ages (less than 40 days). **Conclusions:** Serum-positive horses were regarded as asymptomatic carriers. It was determined that the rate of asymptomatic carriers of *Theileria equi* in Armed Forces (64.45%) is equivalent to the seroprevalence rate published for the rest of the country. Finally, do not rule out a possible route of transmission of *Theileria equi* in the mare to foal during gestation.

KEYWORDS: *Theileria equi*, molecular diagnosis, equids.

¹ TCol. Veterinario. Doctor en Veterinaria. Organismo Autónomo Cría Caballar de las Fuerzas Armadas. Laboratorio de Investigación Aplicada. Córdoba. España.

Dirección para correspondencia: Jose Luis Vega Pla. Laboratorio de Investigación Aplicada. Apto. Correos nº 2087. 14080-Córdoba. Telf.: 957 32 53 12. Fax.: 957 32 24 93.

Recibido: 28 de junio de 2010

Aceptado: 30 de junio de 2010

INTRODUCCIÓN

El Organismo Autónomo Cría Caballar de las Fuerzas Armadas se rige por su Estatuto aprobado en el Real Decreto 1664/2008, de 17 de octubre y tiene por misión la crianza, selección y puesta a disposición de los Ejércitos, de las Unidades de Caballería de la Guardia Real y de la Escuela Militar Ecuestre del ganado equino

necesario para dotar sus necesidades. Ejerce la formación ecuestre en el ámbito militar y colabora con otras entidades públicas y privadas en actividades propias del Organismo. Dispone para el cumplimiento de sus funciones de instalaciones en seis complejos agropecuarios, con un total de 3.372 hectáreas y unas 1.500 cabezas de ganado en Andalucía, Aragón, Castilla y León, Cantabria y País Vasco y de un Laboratorio de Investigación Aplicada.

A requerimiento de Comunidades Autónomas y Corporaciones Locales el Organismo presta apoyo al sector ganadero mediante el despliegue de Paradas en distintas localidades. Por esta actuación complementaria se percibe el correspondiente precio público. Esta actividad conlleva una exposición periódica a diferentes agentes patógenos de forma que el propio Organismo Autónomo se constituye como un verdadero observatorio de enfermedades equinas a nivel nacional. Esta circunstancia pone al Ministerio de Defensa en una situación de privilegio para abordar investigaciones sobre enfermedades consideradas endémicas o establecer mecanismos de alerta temprana sobre enfermedades emergentes a nivel nacional. Esta actividad se realiza al amparo de la disposición adicional tercera «Competencias de otros ministerios» de la Ley 8/2003, de 24 de abril, de Sanidad Animal donde establece que [...]Las disposiciones de esta ley, cuando afecten a animales adscritos a los Ministerios de Defensa y del Interior y sus organismos públicos, se aplicarán por los órganos competentes de los citados departamentos, salvo en los supuestos de importación o exportación, en que se aplicará lo dispuesto en el capítulo II del título II de esta ley.

El Organismo Autónomo Cría Caballar de las Fuerzas Armadas, por su organización y funcionamiento, se constituye en un campo de experiencias privilegiado para la aplicación de modernas tecnologías en la identificación y lucha contra las enfermedades equinas a nivel nacional.

En este trabajo se aborda una de las enfermedades equinas más difundida en la cabaña nacional y en la que hay una disparidad entre la realidad clínica y la epidemiológica, se trata de la Piroplasmosis Equina producida por el hemoparásito denominado *Theileria equi*.

La Piroplasmosis Equina es una enfermedad de caballos, mulas, asnos y cebras, producida por protozoos y transmitida por garrapatas. Los agentes etiológicos son parásitos de la sangre llamados *Theileria equi* y *Babesia caballi*. Anteriormente *Theileria equi* se designaba como *Babesia equi* pero por las características propias de este parásito fue integrado en el género *Theileria*¹. Los animales infectados pueden ser portadores de estos parásitos durante mucho tiempo y actuar como fuentes de infección para las garrapatas, que actúan como vectores de transmisión, aunque no se descarta una vía transplacentaria de la yegua al potro. Los parásitos se localizan dentro de los eritrocitos de los animales infectados.

La introducción de animales portadores en áreas con una elevada tasa de prevalencia de garrapatas vectoras puede conducir a una distribución epizootica de la enfermedad.

La Piroplasmosis es endémica en la mayor parte de las áreas tropicales y subtropicales del mundo estando menos extendida en zonas con temperaturas más suaves². Como resultado de este carácter endémico la enfermedad puede parecer que tiene menos prevalencia que la deducida de los casos clínicos registrados, sin embargo un número aún indeterminado de portadores es el responsable del mantenimiento del endemismo. En estos animales muy pocos parásitos se encuentran en el torrente sanguíneo, lo que dificulta enormemente su detección mediante métodos directos como la tinción de frotis de sangre con el método de Giemsa.

El conocimiento y posible control de la Piroplasmosis Equina en países endémicos es cada día más importante dado el papel que juega esta enfermedad en lo referente al comercio internacional. Así, está considerada como una enfermedad de declaración obligatoria por la Organización Mundial de Sanidad Animal y figura en la lista de enfermedades del Anexo I del Real Decreto 617/2007, de 16 de mayo, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

En España se han publicado algunos estudios sobre la distribución de Piroplasmosis Equina. En 1974 se informó de un caso en el norte de España³, también se han publicado algunos casos de esta enfermedad en Extremadura y Andalucía⁴⁻⁶. Más recientemente destaca un estudio realizado en Galicia⁷.

Los caballos infectados se pueden identificar por observación directa de los parásitos en frotis sanguíneos o de órganos, pero el bajo nivel de parasitemia en animales portadores hace muy difícil la detección de los parásitos.

Una manera de demostrar que ha habido parasitación en animales portadores es estudiar la presencia de anticuerpos específicos en el suero de los mismos. En la actualidad, los ensayos de inhibición competitiva (cELISA), utilizando proteínas recombinantes de los merozoítos de *Theileria equi* y anticuerpos monoclonales contra estas proteínas se constituyen como una de las técnicas de elección para el comercio internacional. Sin embargo, estos ensayos tienen cierta limitación derivada de su sensibilidad y la posible reacción cruzada con otros agentes patógenos⁸.

Las técnicas de análisis molecular puestas al servicio de la parasitología están permitiendo alcanzar cotas de especificidad y sensibilidad muy altas. Así desde hace unos años se están describiendo protocolos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del genoma de la *Theileria equi*^{9,10} que están permitiendo hacer diagnósticos rápidos y fiables aunque aún están pendientes de validación por la Organización Mundial de Sanidad Animal.

Aunque si bien los ensayos de PCR tienen la ventaja de la rápida identificación de los patógenos diana, se basan en medidas que son poco apropiadas para la correcta cuantificación de la secuencia diana. La reciente aparición de la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR) ofrece un método alternativo a la PCR convencional, empleando un sistema de detección lumínica para la medición continua de los productos amplificados a medida que evoluciona la reacción. Esta circunstancia permite realizar una cuantificación de las secuencias dianas originales siempre que se refieran a patrones conocidos.

Normalmente debe esperarse que un individuo con anticuerpos esté protegido frente al parásito una vez superada la fase aguda de la enfermedad. Si la respuesta inmune no es muy intensa o eficaz para eliminar el parásito entonces podría llegar a un estado de equilibrio anticuerpos/parásitos difícil de demostrar. La detección microscópica de los parásitos en muestras de sangre de los portadores asintomáticos no es un hallazgo constante¹¹. En estos casos la sensibilidad de las pruebas de PCR ya han demostrado ser superiores a la de un examen microscópico clásico¹⁰ incrementando la capacidad de identificar portadores entre animales seropositivos.

Este trabajo tiene como objetivo general obtener una información sobre la utilidad de las herramientas moleculares en el conocimiento de la epidemiología de la *Theileria equi* como uno de los agentes etiológicos de la Piroplasmosis Equina. Se establecen para ello tres objetivos específicos:

1. Determinar la correlación entre una prueba serológica para detección de anticuerpos anti-*Theileria equi* y una técnica basada en la identificación de secuencias de ADN específicas de *Theileria equi* para la identificación de portadores asintomáticos.
2. Llevar a cabo un estudio sobre la prevalencia de portadores asintomáticos adultos de *Theileria equi* en la cabaña equina del Organismo Autónomo Cría Caballar de las Fuerzas Armadas.
3. Estudiar la presencia de *Theileria equi* en potros jóvenes pertenecientes al Organismo Autónomo Cría Caballar de las Fuerzas Armadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material animal

Para la consecución de los objetivos planteados se analizaron 482 caballos pertenecientes al Organismo Autónomo Cría Caballar de las Fuerzas Armadas.

Muestras para el estudio comparativo entre las técnicas de diagnóstico de cELISA y de RT-PCR.

Se toman 321 muestras de suero para la técnica cELISA y otras 321 muestras de sangre con anticoagulante para la técnica RT-PCR en los seis Centros Militares de Cría Caballar (Ávila, Écija, Jerez de la Frontera, Mazcuerras, San Sebastián y Zaragoza). Las muestras se extraen entre noviembre de 2009 y enero de 2010 y corresponden a todos los sementales que van a ser desplegados en la Paradas de Sementales del Estado en la temporada 2010 (205) y todas las yeguas reproductoras (79) de los Centros de Militares de Cría Caballar de Mazcuerras-Cantabria y Mazcuerras-San Sebastián (Región Norte). El Organismo Autónomo no dispone de yeguas en la Región Centro (Centros Militares de Cría Caballar de Ávila y Zaragoza). Las hembras de la Región Sur (Centros de Cría Caballar de Écija y Jerez de la Frontera) no se analizan en su totalidad por razones climatológicas y de manejo, se hace entonces un muestreo aleatorio del 15% de la totalidad de yeguas reproductoras obteniendo un total de 37 muestras. Las muestras obtenidas corresponden a individuos de diferentes razas (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de las muestras por raza.

Raza	Nº de muestras
Pura Raza Española	103
Pura Raza Árabe	25
Pura Sangre Inglés	34
Anglo-Árabe	30
Hispano-Árabe	17
Bretón	34
Hispano-Bretón	6
Deporte (sin especificar)	72

Muestras para el estudio de la prevalencia de Theileria equi en potros.

Se toman muestras de sangre de 161 potros de menos de 40 días (Centros Militares de Cría caballar de Écija y Jerez de la Frontera) para ser analizados con la técnica RT-PCR. El muestreo corresponde a la totalidad de potros nacidos en el año 2009 en los Centros citados.

Prueba de enzoinmunoensayo por inhibición competitiva cELISA

La presencia de anticuerpos de *Theileria equi*, en el suero inhibe la unión del anticuerpo monoclonal primario al antígeno que recubre la placa. Dicha unión se detecta con un anticuerpo secundario marcado. Por último, la presencia de anticuerpos secundarios marcados se cuantifica mediante la adición de sustrato de la enzima y posterior desarrollo de productos de color. Desarrollo del color fuerte indica poca o ninguna inhibición del anticuerpo monoclonal primario y por lo tanto la ausencia de anticuerpos en el suero de la muestra. El desarrollo del color débil debido a la inhibición del anticuerpo monoclonal primaria vinculante para el antígeno de la fase sólida indica la presencia de anticuerpos en el suero B. equi muestra.

Se emplea el kit comercial de diagnóstico serológico de amplio uso en el comercio internacional «*Theileria equi* antibody test kit, cELISA» de VMRD, Pullman, WA 99163 USA. Se realizan los análisis siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis mediante PCR a tiempo real

Las técnicas moleculares exigen habitualmente una fase previa de adecuación del DNA de la muestra mediante procedimientos que persiguen desde la simple liberación de las proteínas que lo mantienen compactado, hasta la purificación de la molécula.

Preparación de las muestras

Reactivos

- TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH=8
- Tampón K de Extracción: 40 ml de Tris-HCl 1M (pH=8,5), 20 ml de NaCl 2,5M, 10 ml de EDTA 0,5M,

Procedimiento

- Mezclar 5 µl de sangre con 500 µl de TE en un microtubo tipo Eppendorf de 1,7 ml.
- Agitar y centrifugar a 10.000 g durante 10 seg.
- Eliminar el sobrenadante, añadir de nuevo 500 µl de TE, resuspender el botón celular y agitar.
- Centrifugar de nuevo y repetir la operación al menos una vez más o hasta que el botón celular tome un color blanquecino.
- Eliminar el sobrenadante y añadir 100 µl de Tampón K y 1 µl de proteinasa K (20 mg/ml H₂O).
- Incubar a 56 °C durante 45 min. y a continuación inactivar la actividad residual de la proteinasa K incubando a 95 °C durante 10 min.
- Conservar a –20 °C.

Protocolo de RT-PCR para Theileria equi con sonda específica

Para detectar *Theileria equi* se emplea la técnica propuesta por Kim y col. (2008)¹². Se lleva a cabo una RT-PCR de secuencias específicas del gen que codifica para la unidad 18S de rARN ribosomal. Se emplean los cebadores Be18SF (5'-GCGGTGTTTCGGTGATTCATA-3) y Be18SR (5'-TGATAGGTCAGAACTTGAATGATACATC-3') junto

con la sonda Be18SP marcada en su extremo 5' con HEX y en el extremo 3' con BHQ1 (5'-AAATTAGCGAATCGCATGGCTT-3').

En ambos casos la amplificación se lleva a cabo en un volumen final de 20 µl conteniendo 4 µl de la solución de DNA obtenida. Cada reacción contiene 67 mM Tris-HCl pH 8,8, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxinucleosido trifosfato, 200 nM de cada uno de los cebadores, 100 nM de la sonda y 0,5 U de Taq DNA polimerasa (Imolase, Bioline).

Se emplea un equipo *LightCycler® 480 Real Time PCR Instrument* (ROCHE) y se programa con una fase de activación de la polimerasa de 10 min a 95°C, seguida de 55 ciclos con una etapa de desnaturalización a 95°C durante 45 seg, una de hibridación a 60°C durante 30 seg y una de extensión a 72°C durante 30 seg. En la fase de extensión se hace la adquisición de la fluorescencia emitida por la sonda a una longitud de onda de 610 nm.

En una reacción de PCR, la cantidad o número de copias de moléculas de ADN se duplica en cada ciclo, pero, debido a una serie de factores, esto rara vez ocurre en condiciones experimentales. Por lo tanto, la eficiencia de la PCR puede variar entre el 2, correspondiente al duplicado de la concentración de ADN en cada ciclo, y un valor de 1, si no se produce amplificación.

Se determina el ciclo umbral (Ct) de cada muestra positiva considerando negativas aquellas que se encuentran por debajo del límite de detección de la técnica. Se calcula en base a una dilución decimal de un control positivo con una eficiencia superior a 1,7.

El cálculo de la eficiencia se lleva a cabo con la aplicación informática «LightCycler 480 Software». Se pone a punto la técnica de amplificación tomando como referencia las indicaciones propuestas por Kim y col. (2008)¹² y modificando los parámetros necesarios para que la RT-PCR sea óptima empleando los reactivos y equipamientos propios. El primer paso es establecer el ciclo umbral (Ct) a partir del cual los resultados deben considerarse negativos. Kim y col. (2008)¹² establecieron que la sensibilidad de la técnica era de 1,5 parásitos/ul de sangre circulante. Este será, por lo tanto el valor equivalente del ciclo umbral que se establezca.

Con el fin de compensar las fluctuaciones de la eficiencia de la reacción entre los experimentos, se emplea un control positivo y una dilución decimal del mismo que permita hacer las correcciones necesarias del ciclo umbral entre experimentos. El control positivo procede de una muestra diagnosticada mediante la observación directa del parásito en una tinción tomada de un animal con signos clínicos de piroplasmosis. Se obtiene una eficiencia de 1,73 y se establece la dilución 10⁻⁴ como el límite de detección de la técnica (Figura 1). Se desestiman las reacciones con eficiencias por debajo de 1,7.

Tratamiento estadístico

Para el análisis de los resultados se utilizaron parámetros estadísticos de sensibilidad (Se) y especificidad (Es), mediante una

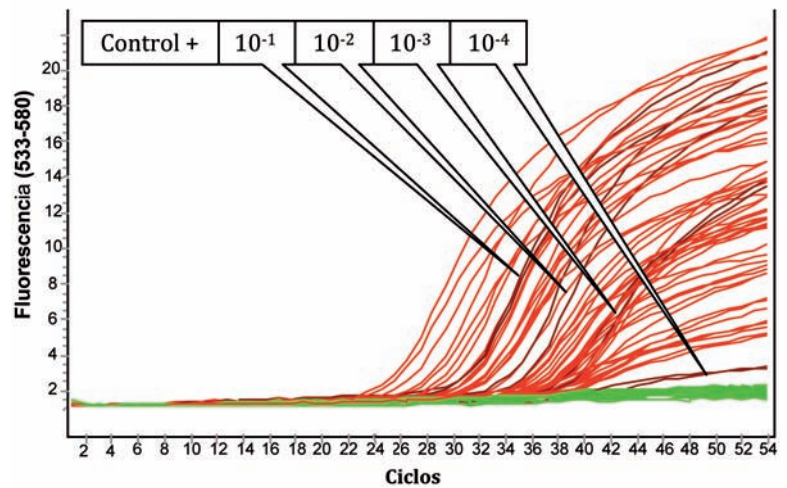


Figura 1. Curvas de amplificación de la secuencia de *Theileria equi* con indicación de las diluciones decimales del control positivo. En verde muestras negativas, en rojo muestras positivas

tabla de 2x2, donde el sistema de referencia fue la prueba de cELISA frente a la RT-PCR (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación cruzada de las pruebas de cELISA y RT-PCR. (N): Número total de muestras comparadas

cELISA	RT-PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	A	B	A+B
Negativo	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	(N)

Se usa la prueba de McNemar¹³ con el fin de comprobar la hipótesis nula que se plantea, es decir, los resultados de las dos técnicas son equivalentes. Se utiliza el método estadístico de Kappa (K), con un nivel de confianza de 95%, para determinar el grado de concordancia entre ambas pruebas, descartando el azar¹⁴. Éste método se emplea también para observar la correlación existente entre potros positivos y madres positivas. Finalmente calcula el coeficiente de correlación existente entre los índices de densidad óptica (DO) obtenidos por cELISA frente a los ciclos umbrales (Ct) detectados por la RT-PCR en los casos positivos.

Los cálculos estadísticos se llevan a cabo con la aplicación informática *GraphPad Software* (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>)¹⁵.

RESULTADOS

Análisis de comparativo entre las técnicas de serología y molecular

Los resultados de analizar las 321 muestras de suero mediante la técnica de enzimoimmunoensayo competitiva (cELISA) y los resultados de analizar las muestras de sangre mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR) se expresan separados por regiones en la Tabla 3 y por sexos en la Tabla 4.

Tabla 3. Resultados obtenidos con las dos pruebas en las diferentes regiones donde se ubican las seis ganaderías estudiadas.

Región	cELISA				RT-PCR			
	Pos.	%	Neg.	%	Pos.	%	Neg.	%
Norte	75	51,72	70	48,28	74	51,03	71	48,97
Centro	47	59,49	32	40,51	44	55,70	35	44,30
Sur	85	87,63	12	12,37	87	89,69	10	10,31
Total	207	64,45	114	35,51	205	63,86	116	36,14

Tabla 4. Resultados obtenidos con las dos pruebas por sexo en las seis ganaderías estudiadas.

Sexo	cELISA				RT-PCR			
	Pos.	%	Neg.	%	Pos.	%	Neg.	%
Machos	135	65,85	70	34,15	133	64,88	72	35,12
Hembras	72	62,07	44	37,63	72	62,07	44	37,93
Total	207	64,45	114	35,51	205	63,86	116	36,14

Se aprecia un porcentaje de animales positivos en ambas técnicas claramente superior en el Sur (Centros Militares de Cría Caballar de Écija y Jerez de la Frontera). Con respecto a machos y hembras no parece haber grandes diferencias en los porcentajes de positividad.

Con los resultados de las pruebas de cELISA y RT-PCR para el conjunto de los animales se construye una tabla de contingencia 2 x 2 (Tabla 5).

Tabla 5. Tabla de contingencia 2 x 2 con los resultados globales de las dos pruebas realizadas.

cELISA	RT-PCR		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	200	7	207
Negativo	5	109	114
Total	205	116	321

Test de McNemar

Los resultados indican que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos con la prueba de enzimoimmunoensayo competitiva (cELISA) y la detección del parásito en sangre con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). En este estudio hay 12 parejas discordantes. Hay 7 casos en los que habiendo anticuerpos circulantes no se detecta el parásito en sangre. Por el contrario hay 5 casos en los que detectándose el parásito no hay respuesta de anticuerpos.

El valor de probabilidad obtenido equivale a 0,79 por lo que los resultados de las dos técnicas son estadísticamente iguales. Atendiendo al tipo de discordancia, es igualmente probable que se de un caso de detección de parásito en un individuo sin anticuerpos que lo contrario. Para un intervalo de confianza del 95% esta proporción varía entre 0,30 a 3,34.

Índice Kappa

El índice Kappa expresa una relación entre la concordancia de los resultados obtenidos en las dos técnicas y los que se obtendrían debido al azar. Las concordancias observadas se elevan a 309 (96,26%) y las esperadas debidas al azar sería 174 (52,20%). Estos cálculos asignan

a Kappa un valor de 0,91 variando entre 0,86 y 0,95 en un intervalo de confianza del 95%, lo que lleva a considerar la concordancia como «muy buena» entre los resultados serológicos (cELISA) y de presencia del parásito (RT-PCR).

Coefficiente de correlación

Se calcula el coeficiente de correlación entre los índices de densidad óptica obtenidos en la prueba cELISA y los ciclos umbrales de amplificación detectados en la prueba RT-PCR. El coeficiente de correlación varía entre -1 y +1. Cuando el coeficiente es negativo indica que hay una correlación inversa, cuando es positivo la correlación es directa. Finalmente cuando el coeficiente de correlación se aproxima a 0 la correlación es muy débil. El coeficiente obtenido comparando los resultados de la prueba cELISA y RT-PCR es de 0,08, interpretándose como una ausencia de correlación entre los datos numéricos de ambas técnicas.

Análisis de la presencia de *Theileria equi* en potros

Se investiga la posibilidad de una parasitación temprana en potros, incluso que la vía de transmisión transplacentaria pudiese tener un incidencia significativa con respecto a la transmisión de *Theileria equi* mediante sus vectores habituales. Se observa que hay un 19,26 % de potros parasitados. En la tabla 6 se trata de establecer si hay alguna correlación con significado estadístico entre la presencia del parásito en la madre y en su potro.

Tabla 6. Tabla de contingencia para las variables yegua y potro con respecto a los resultados de RT-PCR para *Theileria equi*.

	Potro Positivo	Potro Negativo	Total
	Yegua Positivo	16	67
Yegua Negativo	10	68	78
Total	26	135	161

Test de McNemar

Los resultados indican que no hay asociación entre los resultados obtenidos de detección del parásito entre las madres y los potros. Hay 77 casos discordantes donde el estado de portador de la madre difiere de la presencia o ausencia del parásito en el potro. En 67 casos (87,01%) el potro nace de una madre portadora y no se parasita. Por el contrario se encuentran 10 potros parasitados (12,99%) cuya madre no es calificada como portadora. El valor de la probabilidad de aceptar la hipótesis nula es de 0,0001. Es decir que se rechaza la hipótesis de considerar a la madre portadora como un factor significativo para explicar la parasitación del potro.

Índice Kappa

El índice Kappa expresa una relación entre la concordancia de los resultados obtenidos entre las madres y potros y los que se obtendrían debido al azar. Se observan 84 concordancias (52,17%) y el número esperado de concordancias debido al azar sería de 78,8

(48,95%). El índice Kappa obtenido arroja un valor de 0,06 variando entre -0,09 y 0,21 para un intervalo de confianza del 95 %. Es decir, que la concordancia entre el riesgo que supone la madre portadora y la posibilidad de transmitir el parásito al potro es significativamente muy baja.

En la tabla 7 se expresan las edades en días de los potros que han resultado ser positivos en los análisis de detección de *Theileria equi* en sangre, así como el resultado obtenido con la prueba RT-PCR para las madres.

Tabla 7. Relación de potros portadores de *Theileria equi* con expresión de su edad en días y el estado de portador de su madre.

Nº de potro	Edad (días)	Resultado Madre
359	21	Negativa
361	40	Negativa
364	27	Negativa
367	37	Negativa
380	27	Negativa
383	27	Negativa
386	15	Negativa
392	24	Negativa
398	19	Negativa
479	39	Negativa
339	34	Positiva
342	15	Positiva
344	31	Positiva
354	27	Positiva
366	37	Positiva
368	39	Positiva
373	13	Positiva
374	36	Positiva
378	36	Positiva
394	26	Positiva
403	26	Positiva
422	27	Positiva
449	37	Positiva
450	24	Positiva
462	31	Positiva
466	22	Positiva

Los potros procedentes de madres no portadoras tienen edades superiores a los 20 días exceptuando dos de ellos, uno de 15 y otro de 19. El resto de potros positivos tienen también edades superiores a 20 días excepto dos de 13 y 15 días.

DISCUSIÓN

Análisis comparativo entre las técnicas de serología y molecular

Los resultados obtenidos indican que la prueba de enzimoimmunoensayo por inhibición competitiva (cELISA) y la de RT-PCR propuesta por Kim y col. (2008)¹² son equivalentes. El significado biológico de este dato es que el animal afectado se encuentra en equilibrio entre la protección que le proporcionan los anticuerpos y el nivel de parásitos intraeritrocitarios. Se ha encontrado *Theileria equi* en la médula ósea de caballos que habían adquirido el parásito de forma natural y sin sintomatología clínica aparente¹⁶. Este hallazgo coincide con los resultados de un estudio previo, en el que se observa la presencia de *Theileria equi* en la médula ósea y

en otros tejidos tras el examen post-mortem de caballos padeciendo la fase aguda de la piroplasmosis inducida experimentalmente¹⁷. Las observaciones de estos últimos autores sugieren una diseminación vascular del parásito a prácticamente todos los órganos durante la fase clínica aguda de la enfermedad. La fase aguda de la enfermedad se caracteriza por la multiplicación de los parásitos en los glóbulos rojos, que posteriormente pueden romperse y liberar merozoitos, lo que permite la infección temporal de otras células¹⁸. En la enfermedad crónica, los parásitos pueden permanecer presentes de forma duradera en el caballo dando lugar a un estado de portador asintomático. No obstante, la localización a largo plazo de estos parásitos, así como los mecanismos subyacentes de su persistencia, aún se desconocen.

Sin embargo, con respecto a la prueba cELISA la sensibilidad y especificidad de ambas técnicas coinciden en más de un 95% aunque es necesario explicar el sentido de las discrepancias entre ambas técnicas (4,36%). La hipótesis de que los resultados falsos positivos se deben a una menor especificidad de los ensayos de RT-PCR puede ser rechazada por los resultados de la amplificación por PCR de tres diferentes fragmentos del genoma llevada a cabo por Pitel y col.¹⁶, sin embargo la técnica RT-PCR empleada tiene un límite de detección de 1,5 parásitos/microlitro¹². Este tipo de discordancia se explicaría si en ciertos momentos pudiese haber una disminución de parásitos circulantes que dificultase su detección y sin embargo se mantuviese la tasa de anticuerpos circulantes. La vida media de un glóbulo rojo es de unos cinco meses mientras que los parásitos pueden persistir en caballos portadores asintomáticos varios años, por lo tanto hay razones para sospechar de la existencia de un mecanismo de replicación recurrente de baja intensidad que mantenga un nivel básico de merozoitos en sangre. La médula ósea, como precursor de las células rojas de la sangre, no debe ser excluido como depósito potencial de *Theileria equi* en caballos clínicamente sanos¹⁶ que podría liberar de forma fluctuante parásitos al torrente sanguíneo.

En el caso del otro tipo de discordancia, aquel en el que se detecta el parásito y no hay nivel de anticuerpos suficiente para la prueba de cELISA, podría ser por que los anticuerpos estuviesen por debajo del nivel de sensibilidad del ensayo o infecciones tan recientes que aún no han desarrollado inmunidad.

Cuando se investiga la correlación entre la tasa de anticuerpos y la concentración de parásitos en sangre (índice de densidad óptica de la prueba cELISA y ciclo umbral de amplificación de la RT-PCR, respectivamente) podría esperarse que fuese positiva o negativa. Es decir, en una correlación positiva un título alto de anticuerpos se correspondería con una carga parasitaria también alta. Sin embargo, en una correlación negativa un título alto de anticuerpos se correspondería con una carga parasitaria pequeña. En este caso no hay correlación alguna. Este fenómeno indica que puede haber fluctuaciones en las descargas de parásitos al torrente sanguíneo. La tasa de anticuerpos contra *Theileria equi* aumenta con la edad hasta que se estabiliza¹⁹. Habitualmente la presencia de anticuerpos específicos es epidemiológicamente útil para medir la respuesta inmune, sin embargo en el caso de *Theileria equi* ésta no refleja explícitamente el nivel de parásitos en sangre.

Hace ya muchos años que se ha postulado que *Theileria equi* debe permanecer como una parasitación de vida larga²⁰⁻²², esta hipótesis se corrobora cuando se observan los resultados obtenidos en sementales que no acceden habitualmente a pastizales, por lo tanto no se han expuesto a la picadura de garrapatas durante años y sin embargo, ofrecen un nivel de parasitación similar al de las yeguas que acceden

a pastizales. La causa más probable es que se infectan siendo potros y *Theileria equi* persiste durante toda la vida del animal.

En definitiva, estos resultados demuestran que en el caso de Piroplasmosis Equina ocasionada por *Theileria equi*, el estado de seropositivo equivale al de portador asintomático.

Análisis de prevalencia de *Theileria equi* en adultos

En el Sur de Europa *Theileria equi* es endémica y las infecciones pueden cursar de forma asintomática, siendo más común que las debidas a *Babesia caballi*^{2, 23}.

En estudios previos realizados en el conjunto de la geografía española, se detectaron un 52,5% de seropositivos a *Theileria equi*²⁴. Más recientemente destaca un estudio realizado por Camacho y col.⁷ donde han encontrado tasas de parasitación de *Theileria equi* del 40% en Galicia.

En el muestreo realizado en los seis Centros Militares de Cría Caballar los resultados ofrecen una prevalencia media del 64,45%, estando parasitados tanto machos como hembras en todas las razas muestreadas. Además se aprecia cómo hay una mayor prevalencia en las muestras tomadas en el sur (Centros Militares de Cría Caballar de Écija y Jerez de la Frontera). Estos resultados coinciden con los estudios previos realizados por Habela y col.²⁴ y por Camacho y col.⁷ y corroboran el estado endémico de la enfermedad como ya se apuntaba en estudios realizados en el Sur de Europa²¹ y que parece acrecentarse hacia el sur de la Península.

Se han publicado numerosos estudios de prevalencia de *Theileria equi* en diferentes partes del mundo. En un análisis epidemiológico realizado recientemente en cuatro zonas de Italia se ha detectado una tasa de parasitación media del 55%²⁵. Se investigan factores que pudiesen condicionar la prevalencia de la enfermedad tales como la raza, la edad, el sexo, el tipo de actividad y el modo alimentarse (pastizales o pienso), sólo éste último resultó ser verdaderamente significativo. En el presente estudio no se ha tenido en cuenta el modo de alimentación en las yeguas por lo que no pueden establecerse posibles diferencias significativas aunque es lógico pensar que los animales que se alimentan en pastizales están más expuestos que aquellos que lo hacen exclusivamente con pienso. Sin embargo, en el caso de los sementales su acceso a los pastizales es prácticamente nulo, por lo que la parasitación tuvieron que adquirirla a la edad de potros. Rugg y col.²⁶ encuentran que la prevalencia de *Theileria equi* en Mongolia es del 78,8% y en China de un 88,8%. En Sudáfrica se detectan un 83% de portadores asintomáticos²⁷ y en Sudán un 63,5%²⁸. En Brasil se detectan un 60,4% de seropositivos²⁹. Se observa que la climatología templada o subtropical puede ser un factor que facilita el asentamiento de la enfermedad dando lugar a un estado endémico de la misma.

Rugg y col.²⁶ observan una fuerte correlación entre la edad y la tasa de parasitación, aunque se debe asociar a efectos ambientales. Así la prevalencia observada de los parásitos en la sangre es una consecuencia de la relación entre la adquisición y la tasa de eliminación. La tasa de adquisición depende de la carga de garrapatas en los pastizales, la tasa de parásitos en las mismas y la proporción de las picaduras de garrapatas a las que se expone el individuo. La velocidad de eliminación depende de la eficacia de la respuesta inmune del huésped a la infección. En este trabajo todo indica que *Theileria equi* llega a un equilibrio temprano con los anticuerpos

y que permanece en el tiempo. Posiblemente los anticuerpos son proporcionados por la madre con los calostros y así se explicaría la baja tasa de casos clínicos (datos no mostrados) con respecto a la prevalencia de la enfermedad.

Análisis de presencia de *Theileria equi* en potros

Se analizan los 161 potros de menos de 40 días. Se observa un elevado porcentaje de animales parasitados con menos de un mes y medio de vida (19,26%), incluso hay dos casos en los que no superan los 20 días. El tiempo necesario para que el parásito se desarrolle hasta el estado de merozoito y dé lugar a las células hijas características (Cruz de Malta) es de 12 a 19 días, por lo que no se puede descartar que el potro haya estado expuesto a las picaduras de las garrapatas en sus primeros días de vida. Cuando se intenta establecer el factor madre como un hecho especialmente significativo para que el potro adquiera el parásito, el test de McNemar indica que hay un excesivo número de casos discordantes. Así hay un porcentaje alto de potros negativos hijos de madres portadoras y diez casos de potros en los que el parásito está presente sin estarlo en su madre. Esta circunstancia podría explicarse, como se indicó anteriormente, por las posibles fluctuaciones de los parásitos en sangre que, en determinados momentos de la vida del potro o de la yegua, se encuentren por debajo del límite de sensibilidad de la técnica RT-PCR (1,5 parásitos/μl).

Con estos resultados no se puede demostrar, pero tampoco descartar, que se produzca una transmisión adicional de carácter vertical de la madre al hijo por vía transplacentaria. Las tesis que apoyan esta hipótesis ya han sido demostradas experimentalmente por Alshopp y col.³⁰ y el porcentaje de potros afectados es ciertamente elevado para la edad que tienen. Por otro lado es una práctica habitual que los potros estén bajo control los primeros días de su vida junto con su madre sin que tengan acceso a los pastizales. Esta circunstancia hace muy improbable su exposición a la picadura de las garrapatas.

En definitiva, la Piroplasmosis Equina provocada por *Theileria equi* es un problema muy grave en la cabaña equina española. Los animales seronegativos se encuentran expuestos a padecer la enfermedad aguda dado el elevado porcentaje de portadores que se ha detectado. Otro gran problema es que el carácter endémico de la enfermedad puede ocasionar problemas con el diagnóstico diferencial entre varias patologías; así la detección de anticuerpos o *Theileria equi* no es suficiente para diagnosticar un cuadro clínico de Piroplasmosis Equina.

La exportación a países como Estados Unidos de Norteamérica o Canadá se dificulta enormemente pues el porcentaje de animales susceptibles de ser rechazados es enorme. En el sentido contrario, importar animales sanos implica a exponerlos a la enfermedad aguda.

Es necesario investigar más sobre tratamientos eficaces que eliminen totalmente el parásito y sobre el desarrollo de vacunas eficaces como postulan Habela y col.²⁴. Mientras tanto, se debe tratar de evitar la expansión de la enfermedad estableciendo medidas de control de las garrapatas, evaluando el estado de portador de cada uno de los caballos y evitando el acceso de los portadores a las zonas libres de *Theileria equi*. Es necesario confirmar o descartar la temprana parasitación de los potros a causa de la madre durante la gestación, pues la prevención se complicaría enormemente teniendo que ir sustituyendo las madres portadoras en aquellas zonas donde las garrapatas estuviesen erradicadas.

CONCLUSIONES

Mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR) propuesta por Kim y col. (2008) se confirma que hay una alta correlación entre los caballos seropositivos a *Theileria equi* con la técnica de enzimoimmunoensayo por inhibición competitiva (cELISA) y los caballos portadores asintomáticos de la *Theileria equi*. Este equilibrio parásito/anticuerpos persiste en el tiempo de forma que los caballos no expuestos a nuevas picaduras de garrapatas mantienen tasas de anticuerpos y parásitos durante toda su vida.

El Organismo Autónomo Cría Caballar de las Fuerzas Armadas no es ajeno a la situación endémica de esta enfermedad en España habiéndose detectado una prevalencia similar a la obtenida en otros estudios previos.

El estado de portador asintomático de *Theileria equi* se adquiere de forma muy temprana en potros muy jóvenes, no pudiéndose descartar la transmisión transplacentaria de *Theileria equi* para el de mantenimiento la prevalencia de la Piroplasmosis Equina.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo cuenta con la autorización del Excmo. Sr. Director Gerente del Organismo Autónomo Cría Caballar de las Fuerzas Armadas. Agradezco además la colaboración prestada por todo el personal del Laboratorio de Investigación Aplicada y más en concreto al Subteniente D. Rafael Jiménez Seguí por su ayuda con las técnicas de extracción de ADN y al Brigada D. Jose Manuel Antúnez Tripijana por el apoyo informático.

FINANCIACIÓN

El estudio ha sido financiado en su totalidad por el Organismo Autónomo Cría Caballar de las Fuerzas Armadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Melhorn, H., Shein, E. The piroplasms: Life cycle and sexual stages. *Advances in Parasitology*. 1984;23:37.
- Friedhoff KT, Tenter AM, Müller I. Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* 1990 Dic;9(4):1187-1194.
- Cordero del Campillo M, Ordaz-Alvarez M, Rojo-Vázquez F, Escudero-Díez A. On equine babesiosis in Spain. *Revista Ibérica de Parasitología*. 1974;34:561-568.
- Romero J, García P. Babesiosis. *Revista Ibérica de Parasitología*. 1981;41:599-600.
- Habela M, Reina D, Nieto C, Verdugo S, Navarrete I. Epidemiología de la babesiosis equina en Extremadura: estudio preliminar. *Medicina Veterinaria*. 1989;6:31-39.
- Coletto L. Equine babesiosis: a disease linked to the extensive horse raising in the pasture land of Extremadura ('dehesa'). *Cahiers Options Méditerranéennes*. 1999;39:273-276.
- Camacho AT, Guitian FJ, Pallas E, Gestal JJ, Olmeda AS, Habela MA, et al. *Theileria* (Babesia) equi and Babesia caballi infections in horses in Galicia, Spain. *Trop Anim Health Prod*. 2005 May;37(4):293-302.
- Papadopoulos B, Perié NM, Uilenberg G. Piroplasms of domestic animals in the Macedonia region of Greece. 1. Serological cross-reactions. *Vet. Parasitol.* 1996 May;63(1-2):41-56.
- Nicolaiewsky TB, Richter MF, Lunge VR, Cunha CW, Delagostin O, Ikuta N, et al. Detection of Babesia equi (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.* 2001 Oct 31;101(1):9-21.
- Rampersad J, Cesar E, Campbell MD, Samlal M, Ammons D. A field evaluation of PCR for the routine detection of Babesia equi in horses. *Vet. Parasitol.* 2003 May 30;114(2):81-87.
- Böse R, Jorgensen WK, Dalgliesh RJ, Friedhoff KT, de Vos AJ. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Veterinary Parasitology*. 1995 Mar;57(1-3):61-74.
- Kim C, Blanco LBC, Alhassan A, Iseki H, Yokoyama N, Xuan X, et al. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of Theileria equi from equine blood samples. *Veterinary Parasitology*. 2008 Feb 14;151(2-4):158-163.
- Daniel, D.W. Applied nonparametric statistics. Boston, USA: Houghton Mifflin Co.; 1978.
- Whimster, W.F. Biomedical research. How to plan, publish and present it. London: Springer Verlag; 1997.
- GraphPad QuickCalcs: free statistical calculators [Internet]. [cited 2010 Mar 19]; Available from: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>
- Pitel P, Pronost S, Scribe T, Léon A, Richard E, Fortier G. Molecular detection of Theileria equi and Babesia caballi in the bone marrow of asymptomatic horses. *Vet Parasitol* [Internet]. 2010 Feb 4 [cited 2010 Mar 10]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20185243>
- Alhassan A, Iseki H, Kim C, Yokoyama N, Igarashi I. Comparison of polymerase chain reaction methods for the detection of Theileria equi infection using whole blood compared with pre-extracted DNA samples as PCR templates. *Trop Anim Health Prod*. 2007 Jun;39(5):369-374.
- Ali S, Sugimoto C, Matsuda M, Sugiura T, Kanemaru T, Onuma M, et al. Protein characterization of Babesia equi piroplasms isolated from infected horse erythrocytes. *Parasitol. Res.* 1993;79(8):639-643.
- Rüegg SR, Heinzmann D, Barbour AD, Torgerson PR. Estimation of the transmission dynamics of Theileria equi and Babesia caballi in horses. *Parasitology*. 2008 Abr;135(5):555-565.
- Hourrigan, J.L., Knowles, R.C. Equine piroplasmosis (E.P.). *American Association of Equine Practitioners Newsletter*. 1979;1:119-128.
- Schein E. Equine babesiosis. En: *Babesiosis of Domestic Animals and Man* (ed. Ristic, M.). Boca Raton (FL), USA.: CRC Press, Inc.; 1988. p. 197-208.
- de Waal DT, Heerden J. Equine babesiosis. En: *Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to South Africa*. Cape Town: Oxford University Press; 1994. p. 295-304.
- Bashiruddin JB, Cammà C, Rebêlo E. Molecular detection of Babesia equi and Babesia caballi in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. *Vet. Parasitol.* 1999 Jul;84(1-2):75-83.
- Habela MA, Sevilla RG, Corchero E, Peña J. Diagnóstico y tratamiento de la Piroplasmosis equina. *MG Mundo Ganadero*. 2000;127:62-68.
- Moretti A, Mangili V, Salvatori R, Maresca C, Scoccia E, Torina A, et al. Prevalence and diagnosis of Babesia and Theileria infections in horses in Italy: A preliminary study. *Vet. J* [Internet]. 2009 Abr 23 [cited 2010 Mar 10]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19394253>
- Rüegg SR, Torgerson P, Deplazes P, Mathis A. Age-dependent dynamics of Theileria equi and Babesia caballi infections in southwest Mongolia based on IFAT and/or PCR prevalence data from domestic horses and ticks. *Parasitology*. 2007 Jul;134(Pt 7):939-947.
- Bhoora R, Quan M, Franssen L, Butler CM, Van der Kolk JH, Guthrie AJ, et al. Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of Babesia caballi and Theileria equi infections in horses from South Africa. *Veterinary Parasitology*. 2010 Mar 25;168(3-4):201-211.
- Salim BOM, Hassan SM, Bakheit MA, Alhassan A, Igarashi I, Karanis P, et al. Diagnosis of Babesia caballi and Theileria equi infections in horses in Sudan using ELISA and PCR. *Parasitol. Res.* 2008 Oct;103(5):1145-1150.
- Ribeiro MF, Costa JO, Guimarães AM. Epidemiological aspects of Babesia equi in horses in Minas Gerais, Brazil. *Vet. Res. Commun.* 1999 Oct;23(6):385-390.
- Allsopp MT, Lewis BD, Penzhorn BL. Molecular evidence for transplacental transmission of Theileria equi from carrier mares to their apparently healthy foals. *Vet. Parasitol.* 2007 Sep 1;148(2):130-136.