

XV

SITUACIÓN ACTUAL DE LA PIROPLASMOSIS
EQUINA EN ESPAÑA Y SU REPERCUSIÓN EN EL
COMERCIO INTERNACIONAL DEL PRE

M.A. HABELA MARTINEZ-ESTELLEZ,
A. MORENO CASERO, G. MONTES CORTES

*Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Facultad de Veterinaria de Cáceres.
Universidad de Extremadura
E-mail: mahabela @ unex. es*

La Piroplasmosis Equina es una enfermedad protozoaria causada por diferentes especies incluidas dentro del género *Babesia* y *Theileria*. Es un proceso febril que afecta a caballos, asnos y sus híbridos y que es transmitida por garrapatas, pudiendo las cebras en determinados países tropicales comportarse como reservorios de la enfermedad (KUTTLER, 1988).

La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida por países con climatología tropical y subtropical y también, aunque en menor medida, por países de clima templado. No obstante, su presencia está asociada a la de los ixodidos vectores (SCHEIN, 1988).

Los agentes causales de la enfermedad son protozoos hemáticos del género *Babesia* y *Theileria*, siendo dos las especies capaces de infectar a los équidos: *B. caballi* y *T. equi* (NUTTALL y STRICKLAND, 1910), las cuales pueden actuar aisladas o asociadas.

La infección por estos parásitos intraerocitrarios puede tener graves repercusiones clínicas, sobre todo cuando *T. equi* se encuentra involucrada, al ser esta especie más patógena.

Las manifestaciones clínicas se presentan tras un periodo de incubación que oscila entre 5-28 días, y consisten en fiebre (39-42 °C), anemia hemolítica, ictericia, anorexia, depresión, a veces hemoglobinuria, pudiendo concluir el proceso en la muerte (PURNELL, 1981).

La importancia actual de la Piroplasmosis Equina radica en la capacidad de difusión de la enfermedad, la cual puede tener lugar a través de équidos portadores o de garrapatas infectadas introducidas en áreas libres de estos parásitos; sirvan de ejemplo los focos detectados en Estados Unidos en 1961 causados por *B.caballi* o en 1965 por *T. equi* (KNOWLES y col., 1966). También en Australia, zona libre de enfermedad hasta 1976, se describen casos a partir de esa fecha, ocasionados por

T. equi, posiblemente introducida por équidos procedentes de España (MAHONEY y col., 1977).

Estos hechos han propiciado que esta enfermedad sea considerada por el Código Zoosanitario Internacional como sujeta a medidas especiales y en consecuencia determinados países, hoy libres de la enfermedad, han modificado sus reglamentos zoosanitarios para exigir que todos los animales a importar estén libres de babesiosis, incluso en estado de latencia; cabe citar a Estados Unidos, Canadá, Australia, Japón, etc., entre otros.

Las repercusiones económicas sobre el comercio internacional de équidos son obvias, siendo precisamente España y Portugal unos de los países más afectados al encontrarse en zona endémica, lo cual limita en gran medida las posibilidades de exportación del "Pura Raza Español" y del caballo "Lusitano", ambas razas de reconocido prestigio internacional.

Por otra parte, esta enfermedad también ha significado un condicionante para el tránsito internacional de équidos deportivos, tal fue el caso de las Olimpiadas de Montreal, donde se impidió la participación a varios caballos procedentes de Francia, Italia, Bélgica, Suiza, Polonia y a todo el equipo chileno, debido a que eran portadores inaparentes de *Babesia*, ya que la infección se encontraba en estado latente (DORCHIES, 1976; FRIEDHOFF, 1982).

A estas pérdidas, caso de nuestros países, debemos añadir aquellas que provienen de los gastos de prevención, tratamientos y de la mortalidad que la enfermedad origina.

DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LA PIROPLASMOSIS EQUINA

Debido a la amplia distribución de los ixodidos potencialmente vectores de la Piroplasmosis Equina, ésta representa un grave problema tanto para el comercio de équidos como para la práctica de los deportes ecuestres a nivel internacional.

Las dos especies reseñadas coexisten en la mayoría de países y regiones, si bien la frecuencia de presentación es superior para *T. equi* (SCHEIN, 1988).

Por ejemplo, en Africa la Piroplasmosis Equina es considerada endémica, alcanzándose cifras de prevalencia de hasta un 93% y 96% en Sudán y Zaire respectivamente.

Igualmente endémica es en Asia, excepto en el norte de la Federación Rusa. Datos conocidos sobre la prevalencia alcanzan máximos en India (47-96%), Irán (66,6%), Kuwait (77,1%), Omán (97,7%) o Arabia Saudí (100%). Contrariamente, Japón está libre de la enfermedad.

En Centro y Sudamérica también la prevalencia es elevada, datos referidos a Colombia para la provincia de Córdoba arrojan cifras del 94-95%, de 40-44% para Chile, del 14- 29% en Argentina o del 72% en Brasil. Se conoce su existencia en otros países como Cuba, desde donde posiblemente se introdujo en Estados Unidos y donde no se ha conseguido la total erradicación, sin embargo la prevalencia es muy baja (2,9%).

En Australia se describe la enfermedad en caballos importados de España, aunque el foco no logró extenderse.

Respecto a Europa son los países nórdicos los que con toda garantía se encuentran libres de la enfermedad, mientras que en Francia, Italia, Grecia, España y Portugal está ampliamente distribuida con cifras que oscilan entre 3- 77%. Respecto a su presencia en otros países como Bélgica, Holanda, Alemania, Suiza, los datos son contradictorios (FRIEDHOFF, 1982; SCHEIN, 1988; KUTTLER, 1988).

En cuanto a España, los primeros casos clínicos denunciados corresponden a los estudiados por ALMARZA HERRANZ y BUESO GOMEZ en 1934 y 1944 respectivamente, ambos en la provincia de Badajoz. Según se recoge en el Índice de Catálogo de Zooparásitos Ibéricos (CORDERO DEL CAMPILLO y col., 1980) ambas especies se distribuyen por Badajoz, Cáceres, Ciudad Real, Córdoba, León, Navarra y Toledo. Nosotros hemos diagnosticado serológicamente la enfermedad en todo el territorio peninsular e islas.

Desde 1991 hasta la actualidad, hemos testado más de 5000 sueros de equinos por inmunofluorescencia indirecta (IFI), la mayoría procedentes de animales PRE aparente sanos (destinados a exportación) y el resto de caballos con clínica compatible con Piroplasmosis. Estas muestras proceden prácticamente de todas las Comunidades Autónomas, habiendo obtenido unas cifras de seropositividad para el conjunto del país del 52,5 frente a *T. equi* y del 21,3 para *B. caballii*, predominando la primera en este, centro, sur peninsular e islas y la segunda en la cornisa cantábrica.

Datos preliminares sobre la seroprevalencia de la enfermedad en Extremadura son aportados por HABELA y col. (1989), quienes obtienen cifras iguales a un 64,22% para *T. equi* y del 28,13% para *B. caballii*. Estudios

posteriores en los que se ha ampliado el muestreo, arrojan cifras para *B. equi* del 46,7% de seropositividad, quedando la seroprevalencia comprendida entre un 15,7% y un 71,8% correspondientes a las comarcas de Jaraíz de la Vera y Valencia de Alcántara respectivamente (GONZALEZ SEVILLA, 2005 y MONTES, 2006).

Información más actualizada sobre la seroprevalencia hallada en Extremadura y Andalucía, comunidades donde asientan gran número de yeguas de PRE, es la que a continuación aportamos: 78 y 23 % de seropositividad frente a *T. equi* y *B. caballi* respectivamente, en la primera comunidad, y del 53 y 20 % para la segunda (GONZALEZ SEVILLA, 2005 y MONTES, 2006).

Los datos obtenidos para Extremadura, son muy similares a los que aporta SABINO SERRA (1988) para algunas regiones de Portugal en su estudio sobre las babesiosis equinas. Este trabajo, concluido en 1984, refleja seroprevalencias para *T. equi* comprendidas entre el 54,7% para Ribatejo y Oeste y 22,5-23,3% para las regiones de Coimbra y Aveiro, respectivamente.

Respecto a *B. caballi*, en el referido estudio, obtienen prevalencias comprendidas entre el 31,3% correspondiente a la región de Ribatejo y Oeste y el 15-16,5% alcanzadas en Coimbra y Aveiro, respectivamente.

CARVALO-VARELA y col. (1989) obtienen cifras para *T. equi* sensiblemente superiores a las anteriormente comentadas. Estos autores observan en Ribatejo una seroprevalencia del 46,78%, sin embargo para *B. caballi* las cifras resultaron ser inferiores (14,1%).

En este estudio se chequearon yeguas adultas, potros sin destetar y potros de 1 a 3 años, así como animales estabulados, estos últimos precisamente son los que menores índices de positividad mostraron, suponemos que debido a las medidas de control aplicadas sobre las garrapatas vectores.

Es posible que los datos obtenidos por nosotros para Extremadura estén más próximos a la prevalencia en zonas como Alentejo, ya que las características medioambientales y sistemas de explotación de ambas regiones son similares.

EPIDEMIOLOGIA Y CONTAGIO

La Piroplasmosis Equina es transmitida en condiciones naturales por garrapatas de los géneros *Dermacentor*, *Hyalomma* y *Rhipicephalus*. En

nuestro país y más concretamente en Extremadura, es posible que sean *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rh. turanicus*, *Hyalomma lusitanicum* o *H. marginatum* los que intervienen en la transmisión, es decir, ixodidos con ciclo biológico de dos o tres hospedadores, teniendo lugar la inoculación de los esporozoitos a los 2-5 días de fijarse el vector. Experimentalmente hemos conseguido por primera vez la transmisión de *T. equi* con *R. bursa* (GONZÁLEZ SEVILLA, 2004).

En las zonas endémicas los potros mantienen contactos con las garrapatas, edad durante la cual están protegidos pasivamente por la inmunidad transferida vía calostro, siendo los casos de babesiosis clínica relativamente raros.

La transmisión de anticuerpos de madre a potro vía calostro la hemos podido constatar serológicamente por medio del test de inmunofluorescencia indirecta, si bien la seropositividad desaparece aproximadamente a los 3 meses postnacimiento (datos sin publicar).

Theileria equi tiene capacidad de persistir en el équido durante años y quizás durante toda la vida del animal, constituyendo éstos los reservorios de enfermedad. Sin embargo, *B. caballi* tiene garantizada su supervivencia a través de generaciones de garrapatas al poderse transmitir transováricamente (LEVINE, 1985; PURNELL, 1981; SCHEIN, 1988).

La situación epidemiológica de la Piroplasmosis Equina en nuestro país podría calificarse de endémica inestable en el norte, donde la relación entre hospedador, agente causal, vector y medio ambiente es incompleta, lo que provoca la aparición clínica de la enfermedad. Esta situación se convierte en más estable a medida que se avanza hacia el sur, alcanzándose una relación más estrecha que permite una virtual ausencia de la enfermedad clínica.

Otras formas de contagio citadas son a través de jeringas contaminadas, transfusiones sanguíneas o caso de *T. equi* vía transplacentaria (LEVINE, 1985; SCHEIN, 1988).

PATOGENESIS Y CLINICA

La patogénesis dependerá de factores propios del hospedador como es la edad (jóvenes más resistentes), estado sanitario, nutricional, inmunitario (corticoterapias prolongadas inmunodepresivas) y de la especie (*T. equi* más patógena), cepa, etc., del parásito.

La acción patógena en infecciones por *B. caballi* se basa, al igual que ocurre en bóvidos en las ocasionadas por *B. bovis*, en la liberación de sustancias farmacológicamente activas (esterasas) que activan la calicreína, ésta a su vez provoca disturbios circulatorios (vasodilatación, incremento de permeabilidad vascular, estasis circulatorio, shock y muerte). Esta acción se ve complementada por la destrucción de eritrocitos (hemolisis).

Por el contrario, *T. equi* centra inicialmente su acción sobre el sistema mononuclear fagocítico (fase linfoproliferativa), para posteriormente provocar una severa anemia, ya que puede alcanzar elevados niveles de parasitemia, próximos al 80% de eritrocitos parasitados y al 100% en animales esplenectomizados.

En ambos casos están presentes los procesos autoinmunes manifestados con fenómenos de eritrofagocitosis (LEVINE, 1985; SCHEIN, 1988).

Desde el punto de vista clínico, la Piroplasmosis Equina tras un periodo de incubación de 12-30 días para *B. caballi* o de 12-15 días caso de *T. equi*, puede presentarse bajo las siguientes formas clínicas: sobreaguda (muerte en 1-2 días), aguda (predominio del síndrome febril y crisis hemolítica) de fácil diagnóstico por la clínica y la abundante presencia de parásitos en el interior de los hematíes y de 7-12 días de duración, subaguda (síntomas atenuados) o crónica (muy escasa sintomatología) de 22 días de duración media. Estas dos últimas formas pueden pasar inadvertida al diagnóstico clínico o parasitológico.

En cualquier caso el proceso se inicia con hipertemia (39- 42° C), que puede ser intermitente en infección por *T. equi* y persistente en caso de *B. caballi*. Se puede apreciar: taquicardia (80-100 p.p.m.), a veces con pulso yugular, disnea, depresión, anorexia, lacrimo intenso, rinorrea, sialorrea, anemia, hemoglobinuria, ictericia, cojeras, parálisis del tercio posterior, edema de cabeza palpebral, de partes ventrales (extremidades, genitales, subcutáneo en abdomen), siendo igualmente común la presencia de hemorragias en mucosas (nasal, vaginal, conjuntiva, etc.).

La pérdida de peso es cada vez más manifiesta, pudiéndose también presentar trastornos gastrointestinales como cólicos, diarreas y graves síntomas bronconeumónicos derivados del edema de pulmón.

Caso de *B. caballi* son frecuentes las cojeras y las afecciones del sistema nervioso central (encefalitis) por oclusión de la luz de los capilares cerebrales, y en infecciones por *T. equi* los abortos ya que en esta especie la transmisión intrauterina es frecuente.

La mortalidad puede oscilar alrededor del 10-50%, siendo inferior en infecciones por *B. caballi*.

DIAGNOSTICO (LEVINE, 1985; SCHEIN, 1988; KUTTNER, 1988)

- **CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO**: basado en la sintomatología típica, presencia de garrapatas, etc.

Por tanto, tiene relativa utilidad y sólo valor orientativo. La presencia de fiebre, decaimiento, tristeza, apatía, anemia, hemoglobinuria, ictericia, etc., en épocas de actividad de ixodidos y en zonas de frecuente presentación, pueden hacernos sospechar, pero nada más. Esta información clínica puede completarse con la aportada por el estudio hematológico y sérico.

Ya se ha dicho que no hay cuadro clínico bajo el cual no pueda presentarse una Babesiosis. Si a ello unimos la necesidad de diferenciar con otros procesos de etiología diversa, nos vemos obligados a la realización de un **diagnóstico laboratorial**, bien directo y/o indirecto.

Por similares motivos a los expuestos, el **diagnóstico anatomopatológico** no aporta suficiente información. El cuadro lesional puede definirse como de diatesis hemorrágica generalizada, con fenómenos de coagulación intravascular diseminada y muerte por shock hipovolémico, por tanto inespecífico y poco concluyente. Por otra parte, en los cortes histológicos es más difícil ver los protozoos que en las extensiones sanguíneas, y si se ven su tamaño es más reducido. De esta manera, Babesias pequeñas podrían diagnosticarse como Anaplasmas.

La utilidad de unas técnicas de diagnóstico laboratorial u otras, depende del tiempo transcurrido desde el inicio del proceso, así como del objetivo perseguido.

- **PARASITOLÓGICO DIRECTO**: observación de formas parasitarias intralinfocíticas (*T. equi*) o intraerocitarias (ambas especies), tras tinción de improntas ganglionares o extensiones sanguíneas. Resulta válido en fase aguda de enfermedad.

La utilización de diferentes **métodos de tinción** (solución de Giemsa, May-Grunwald-Giemsa, Leishmann, Panoptico rápido, etc.) nos permiten poner en evidencia las distintas formas parasitarias presentes, tanto en el hospedador vertebrado (merozoitos, esquizontes) como en el invertebrado (esporoblastos en glándulas salivares, esporoquinetos en hemolinfa u ovario, o gametos en contenido intestinal).

La parasitoscopia es especialmente válida para diagnosticar la enfermedad aguda tanto a nivel individual como en colectividades, ya que es precisamente durante esta fase cuando mayores parasitemias se alcanzan. La extensión fina de sangre, tinción y consiguiente observación de varios campos del microscopio, es suficiente para hallar y determinar el agente etiológico, basándonos en sus características morfológicas y morfométricas. BARNETT en 1977 refería para *Theileria* que la diferenciación morfológica entre especies, es más un arte que una ciencia.

Otros detalles como las formas de los merozoitos: piriformes, anaplasmoides, anulares, de lágrima, etc., pueden igualmente tener valor. Por último, señalar que si la muestra es obtenida y procesada en plena fase de replicación parasitaria, es fácil que encontremos parásitos con morfología muy irregular, los cuales se corresponden con formas germinativas. El examen exhaustivo de la preparación, nos proporcionará alguna imagen fácil de identificar. Transcurridos varios días desde el inicio del proceso clínico, es fácil que la parasitemia descienda resultando más difícil la observación de parásitos, pudiéndose ver en los macrófagos formas fagocitadas. En estos casos, una extensión gruesa o la tinción de gota gruesa y una observación más minuciosa, es recomendable.

Cabe hacer mención especial a *T. equi*, la cual como consecuencia de su replicación en linfocitos (fase linfoproliferativa) previa a la multiplicación en el interior de los eritrocitos (hemoproliferativa), nos permitirá realizar un diagnóstico precoz y fiable tras verificar la infartación ganglionar, después de la pertinente exploración. Para ello efectuaremos una biopsia y procederemos al lavado del material con medio de cultivo (RPMI), realizaremos extensiones y tinciones con los métodos indicados. Trataremos de observar células multinucleadas (esquizontes) en el interior de las células linfoides. Esta fase es rápida, por lo que este método tiene validez limitada.

Si estas observaciones resultaran infructuosas, podríamos intentar el cultivo "in vitro" de células linfoblastoides supuestamente infectadas (Medio RPMI, 2 mM L-glutamina, penicilina-streptomina y 10% de suero fetal bovino inactivado).

En caso de que tengamos que realizar un diagnóstico post-mortem, los improntas de riñón, bazo e hígado podrán ser igualmente teñidos y observados al microscopio, proporcionando imágenes en la mayoría de los casos poco concluyentes.

Debido a la intervención obligatoria de las garrapatas en el ciclo de estos protozoos, cabe la posibilidad de detección de piroplasmidos en diferentes tejidos de ixodidos. Como es sabido, la transmisión en estos casos es de tipo transovárica, aunque existen excepciones como es el caso de *T. equi* que tiene transmisión transestadial.

Independientemente del tipo de transmisión, estamos en condiciones de detectar la presencia de piroplasmas en hemolinfa, ovario, huevos (esporoquinetos), glándulas salivares (esporoblastos) o intestino (gametos), aunque ésta última más difícil y menos empleada con fines diagnósticos.

Dentro de los métodos directos, y gracias a los nuevos avances alcanzados en el campo de la biología molecular, estamos en condiciones de aplicar las **técnicas de amplificación del ADN** en el diagnóstico de enfermedades protozoarias transmitidas por garrapatas.

Las técnicas de **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)** o **Reverse Line Blotting (RLB)**, permiten la identificación de parásitos y diferenciar entre poblaciones próximas. Su eficacia es superior a la de métodos convencionales. Mediante esta técnica se ha logrado determinar la presencia de diversos hemoparásitos (*Babesia*, *Theileria*, *Anaplasma*, *Cowdria*) en ganado bovino.

Por tanto, las ventajas son su elevadísima sensibilidad y especificidad, siendo sus inconvenientes más destacables el tiempo necesario de ejecución y sus costes elevados. No obstante, pensamos puede tener un futuro prometedor, tanto en diagnósticos individuales como en estudios epidemiológicos.

Su elevada especificidad, a la que hicimos referencia, evita la aparición de falsos positivos como consecuencia de reacciones cruzadas, tal y como ocurre en ocasiones cuando se emplean técnicas serológicas, salvando igualmente otras dificultades que pudieran presentarse, como el descenso de los anticuerpos a niveles imperceptibles por las técnicas habitualmente empleadas. La elevada sensibilidad de la PCR nos permite detectar parasitemias de hasta 0,000001%, en caso de *B. bovis* (FIGUEROA y cols., 1994).

Por todo ello, es especialmente útil en el diagnóstico precoz de infecciones por piroplasmas, empleando como muestra problema material linfóide obtenido por biopsia o sangre. Es recomendable su uso para detectar portadores crónicos, en los cuales la parasitemia es tan escasa que difícil-

mente puedan observarse los parásitos, y por supuesto tiene utilidad para detectar ADN del parásito en los tejidos de los ixodidos vectores.

- **PARASITOLÓGICO INDIRECTO:** serológico por reacción de fijación de complemento o inmunofluorescencia indirecta. Ambos son métodos aceptados internacionalmente (Código Zoonosario Internacional), si bien el segundo es más sensible y específico. Poseen máxima aplicabilidad para la detección de casos latentes. El método ELISA debido a sus posibilidades de automatización es interesante para la realización de amplios estudios epidemiológicos, sin embargo de momento no está conseguida la correcta purificación antigénica, considerándose algo inespecífico.

Los **métodos indirectos** de inmunodiagnóstico son empleados para medir la respuesta inmune en Babesiosis y Theileriosis natural o experimental. Son útiles tanto para el diagnóstico individual como en colectividades, en este último caso con el fin de determinar prevalencia y distribución en áreas geográficas más o menos extensas, y así poder planificar el control.

La cinética de anticuerpos detectables por cualquiera de estos métodos en la infección por piroplasmas, queda representada gráficamente por una curva gaussiana ya que aparecen a los 15-20 días de la primo-infección, incrementándose posteriormente. Tras mantenerse en meseta durante 6-10 meses, comienzan a decrecer hasta llegar a niveles basales indetectables, en muchas ocasiones, por estos métodos serológicos.

Han sido numerosos los esfuerzos destinados a desarrollar métodos que permitan medir la respuesta inmune a la infección por *Babesia* y *Theileria*, a pesar de todo no existe una técnica totalmente satisfactoria, al menos para el diagnóstico de las formas latentes.

Cada test tiene sus ventajas e inconvenientes dependiendo del nivel de sensibilidad, especificidad, simplicidad y coste. El grado de cumplimiento de los objetivos perseguidos (diagnóstico individual o en áreas endémicas), es esencial para la evaluación final del método elegido. Muchos investigadores proponen la combinación de al menos dos técnicas, con el fin de incrementar los niveles de confianza del serodiagnóstico.

Resulta fundamental el antígeno empleado para obtener mayor o menor sensibilidad y/o especificidad. Los antígenos utilizados están representados por eritrocitos parasitados, plasma, suero o tejidos de animales, obtenidos siempre en fase aguda de enfermedad o, como precisan algu-

nos autores, con parasitemias superiores al 2%. Estas elevadas parasitemias se alcanzan esplenectomizando o inmunodeprimiendo (corticoides) animales, o tras pases seriados del parásito por animales esplenectomizados, también en el cultivo "in vitro". La cepa del parásito a emplear en la preparación del antígeno, debe ser lo más próxima posible a la que pretendemos detectar.

Reacción de fijación de complemento (RFC).- Fue el primer test desarrollado para la detección de anticuerpos anti-Babesia (HIRATO y cols., 1945). En aquella ocasión se utilizó como antígeno un lisado de eritrocitos parasitados por *B. caballi*, apreciándose anticuerpos 11-15 días después del comienzo del periodo de parasitemia, persistiendo 100 días. Desde entonces se aplicó en el diagnóstico de *B. divergens*, *B. major*, *B. bovis*, *B. bigemina*, *T. equi*, etc., experimentando algunos cambios en lo que a obtención del antígeno se refiere, pues restos de eritrocitos y hemoglobina podían ser motivo de reacciones cruzadas cuando era conservado liofilizado.

Esta técnica fue aceptada oficialmente por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos como prueba de referencia en el diagnóstico de Piroplasmosis equina.

En general, esta técnica es considerada altamente específica para el diagnóstico de Piroplasmosis; sin embargo, tiene limitaciones derivadas de su pobre sensibilidad si se compara con la IFI.

Respecto a los casos crónicos, la técnica detecta la persistencia de la infección, pero resultan un número relativamente alto de falsos negativos, posiblemente debido a la corta vida de los anticuerpos detectables por ella. Igualmente no es recomendable su uso para evaluar resultados de vacunación o tratamiento.

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).- Esta técnica desde su descripción original por RISTIC y cols. (1964), empleada entonces en el diagnóstico de Piroplasmosis Equina, ha sido utilizada en prácticamente todas las especies animales (bovinos, ovinos, cánidos, etc.) e incluso el hombre, con los mismos objetivos.

Parece existir una opinión unánime sobre su mayor especificidad y sensibilidad que RFC. Algunos autores describen ciertas reacciones cruzadas entre especies. Otros no sólo no las hallan sino que refuerzan sus argumentos en favor de esta técnica respecto a la RFC.

Los anticuerpos fluorescentes son detectados inmediatamente después de establecida la infección, persistiendo periodos más prolongados (hasta 420 días post-infección en *B. ovata*). No obstante, estas características pueden variar según el antígeno empleado, porcentaje de parasitemia, etc. En parte, estos problemas se han resuelto con la consecución del cultivo "in vitro" de determinados Piroplasmas.

En caso de *T. equi* existe la posibilidad de preparar antígeno a base de eritrocitos parasitados o de linfocitos con esquizontes, observándose un descenso más rápido en los anticuerpos frente a éstos que frente a los primeros.

Por tanto, la IFI permite el diagnóstico de Piroplasmosis subagudas y crónicas. Sirve para la identificación de especies, incluso en infecciones mixtas, y resulta útil para la realización de estudios seroepidemiológicos, detección de portadores crónicos, así como valorar ensayos de inmunización.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).- Esta técnica es muy sensible y económica siempre que se consiga una correcta purificación de los antígenos. Problemas de reacciones cruzadas, derivados de la utilización de extractos de antígenos somáticos o metabólicos poco purificados en diferentes especies de Piroplasmas, han sido descritos por diversos autores. Sin embargo, otros consideran al test con una sensibilidad comparable a la IFI y útil para el diagnóstico de casos clínicos y asintomáticos, demostrándose reacciones positivas hasta 250 días post-infección y 70 días después del tratamiento con Berenil. También mediante esta técnica no se observaron reacciones cruzadas entre *Babesia*, *Theileria* y *Anaplasma*.

En definitiva, el test de ELISA es útil para el diagnóstico; sin embargo, debido a las reacciones cruzadas no es posible identificar especies en infecciones mixtas. Su empleo, de momento, debe limitarse a chequeos seroepidemiológicos debido a sus posibilidades de automatización. Es recomendable avanzar en especificidad, capacidad de reproducción de protocolo y análisis de costes/eficacia.

La preparación de antígenos definidos y el uso de antígenos de cultivos purificados, harán de esta técnica una adecuada herramienta en el serodiagnóstico de Babesiosis.

- **Diferencial:** Ehrlichiosis (*Ehrlichia equi*), Anemia Infecciosa Equina, Peste Equina, Tripanosomosis, Leptospirosis, intoxicaciones, etc.

TRATAMIENTO (KUTTLER, 1981; KUTTLER y col., 1987, SCHEIN, 1988; ZAUGG y LANE, 1989)

La Piroplasmosis Equina puede ser tratada con los siguientes fármacos:

- Aceturato de diminaceno (Berenil, ®) a dosis diaria de 4-5 mg/kg p.v. hasta desaparición de la sintomatología o a dosis de 11 mg/kg p.v. en única inyección, resulta ser eficaz para tratar la infección por *B. caballi*. En caso de *T. equi* puede ser requerida la repetición del tratamiento, no llegando en cualquier caso, a la esterilización del animal.

- Amicarbalidas: una simple inyección de 9-10 mg/kg p.v. es suficiente para el tratamiento de ambas infecciones. Dosis superiores causan graves efectos secundarios, no consiguiéndose la total eliminación de *T. equi*.

- Dipropionato de imidocarb (Imizol, ®): una única dosis de 2-3 mg/kg p.v. recupera de la infección por *B. caballi*, siendo necesaria la repetición a las 24 horas para su eliminación. En infecciones por *T. equi*, esta segunda inyección terapéutica, a la misma dosis o superior, es necesario repetirla a las 48 horas, no consiguiendo la esterilización, tan sólo un descenso transitorio de los títulos de anticuerpos fijadores de complemento aunque no de los fluorescentes. La aplicación de dosis altas como 4 inyecciones de 4 mg/kg p.v. cada 72 horas puede tener graves problemas de intoxicación (antídoto sulfato de atropina), no alcanzándose tampoco la eliminación total del parásito.

- La esterilización frente a *B. caballi* según KUTTLER (1981) puede obtenerse mediante los tratamientos siguientes:

Aceturato de diminaceno 11 mg/kg p.v. 2 veces 24h intervalo

Amicarbalida 8,8 mg/kg " " " " "

Imidocarb 2,2 mg/kg " " " " "

Para otros autores ello supone el empleo de dosis de babesicidas en el límite de la toxicidad.

T. equi es más refractaria a este tratamiento y el estado de portador inaparente es difícil, por no decir imposible, erradicar.

Se ensayan fármacos con poder theilericida en el tratamiento de la piroplasmosis ocasionada por *T. equi*, tales como la parvaquona (Clexon ®, Parvexon ®, Flubexon ®) o la buparvaquona (Butalex, ®). Respecto a la primera, la inyección intramuscular a la dosis de 20 mg/kg p.v. parece ser eficaz, aunque no se consigue la esterilización. Del mismo modo, la buparvaquona resulta ser terapéuticamente efectiva a la dosis de 4-6 mg/

kg p.v. vía intramuscular o endovenosa, siendo ineficaz en la eliminación del estado de portador (KUTTLER y col., 1987; ZAUGG y LANE, 1989).

En un estudio recientemente publicado, en el cual se realizaron ensayos terapéuticos con buparvaquona sobre 40 caballos, tan solo un animal consiguió quedar completamente libre de la infección por *T. equi*. La dosis empleada del producto fue de 2,5 mg/kg p.v. y la vía de inoculación fue intramuscular, inyectando 4 veces con 96 horas de intervalo (ZAUGG, 1993). En este mismo trabajo en el que se ensayan diferentes dosis de buparvaquona y distintas vías y pautas de administración, se llega a la conclusión que la dosis de 2,5 mg/kg p.v. es suficiente, siendo la vía endovenosa la de elección, al evitarse efectos secundarios como laminitis, pobre absorción, dolor en el punto de inoculación cuando se administra intramuscular.

CONOCIMIENTO Y GRADO DE CONCIENCIACIÓN DE LOS PRODUCTORES DE CABALLOS PURA RAZA ESPAÑOLA ACERCA DE LA PE (HABELA Y COLS, 2005).

El principal objetivo de este estudio fue conocer el grado de concienciación del sector productor acerca de la Piroplasmosis Equina, así como llegar a una estimación aproximada de las repercusiones económicas derivadas de esta enfermedad (gastos de diagnóstico, tratamientos, muerte de efectivos, etc.) en las yeguas de PRE.

Una tarea primordial para el desarrollo de nuestro proyecto, consistió en el diseño preliminar de la encuesta con objeto de obtener la máxima información posible sobre el grado de conocimiento del sector acerca de la Piroplasmosis equina. Posteriormente, ésta se remitiría a todas las Yeguas y Criadores de PRE (ANCEE: Asociación Nacional de Criadores de Caballos Españoles, AECCPRE: Asociación Extremeña de Criadores de Pura Raza Española y CABAEX: Caballos de Extremadura, AACPRE: Asociación Andaluza de caballo PRE, etc.) que accedieron desinteresadamente a colaborar con nosotros, lo cual desde aquí ya agradecemos, pues su participación supuso una imprescindible y valiosísima fuente de información.

Podemos afirmar que la Piroplasmosis equina es conocida por casi toda la totalidad de los ganaderos productores de PRE encuestados. La gran mayoría de los profesionales saben que es transmitida por picaduras de garrapatas infectadas y el 51.8% de ellos afirma tener conocimiento

de antecedentes de esta enfermedad en su explotación y solo un 22% tiene constancia de poseer portadores crónicos, sin embargo las cifras de prevalencia que nosotros hemos obtenido en la mayoría de explotaciones de Andalucía, Extremadura y Castilla la Mancha son lo suficientemente elevadas como para que esta enfermedad no pase desapercibida, sin desconsiderar a otras comunidades autónomas, pues según los resultados de nuestros estudios sero-epidemiológicos de Piroplasmosis equina para el conjunto del país, ésta puede ser calificada de endémica e inestable en todo el territorio nacional. El predominio de la situación epidemiológica de portador crónico o inaparente, es decir, el estado de latencia en la mayoría de los casos hace que este proceso parasitario pase inadvertido desde el punto de vista clínico ante los ganaderos. Hemos de reconocer que la morbilidad en Piroplasmosis Equina es baja y el cuadro sintomático salvo en ocasiones no suele ser rico en signos clínicos, de donde deriva la dificultad de diagnóstico en muchas ocasiones, siendo los animales sometidos a ejercicios físicos los que mayoritariamente muestra signos de debilidad, bajo rendimiento y resistencia a los ejercicios, ligera anemia, etc. síntomas no perceptibles en animales destinados a otras aptitudes.

De todos modos, a pesar de ser una enfermedad que cursa con baja mortalidad algunos de los ganaderos manifiestan haber sufrido bajas (14,8%). No obstante y aunque resulta difícil realizar diagnósticos clínicos, la mayoría de los casos fueron diagnosticados por los veterinarios de la explotación, recurriendo un bajo porcentaje a los métodos laboratoriales que siempre proporcionarían una mayor precisión y fiabilidad; también un buen número de ganaderos desconoce cómo, quién y en dónde se realizan los diagnósticos. No queremos subestimar la experiencia de los veterinarios equinos, pero si consideramos oportuno recomendar la necesidad de complementar el diagnóstico clínico-epidemiológico con pruebas laboratoriales que ayudan a determinar las especies implicadas con objeto de prescribir el tratamiento etiológico específico, ya que este difiere según se trate de una infección por *Theileria equi* o por *Babesia caballi*.

Desde el punto de vista epidemiológico, todos los ganaderos son conscientes de la participación de las garrapatas en la transmisión de la enfermedad y por tanto el riesgo que éstas representan para el ganado mantenido, la mayoría del año, en pastos y praderas. A pesar de esto, un número importante de los encuestados no parece observar infestación por garrapatas, aunque la mayor parte de ellos si detecta su presencia durante los meses de primavera-verano, periodo coincidente con el de

máximo riesgo de infección. La mayoría de los ganaderos mostraron poco interés por los posibles vectores de Piroplasmosis Equina, por lo que no se encargaron estudios de identificación de garrapatas, investigaciones básicas para predecir los riesgos y establecer pautas estratégicas de control en base a las características biológicas de cada especie. Concluimos esta parte más técnica del cuestionario preguntando sobre el tratamiento y la prevención, sobre la cual el ganadero no suele estar ampliamente informado. Como era de esperar esta serie de cuestiones no es contestada por el 59,2% de los encuestados, sin embargo, no debemos despreciar el grado de información del resto acerca de los babesicidas, theilericidas y así como de los acaricidas disponibles en el mercado, los cuales son reconocidos por un elevado número de ellos, teniendo conocimiento de su uso tanto para el tratamiento como para la prevención. En lo que respecta a la segunda parte del cuestionario apreciamos como los encuestados muestran cierto recelo a facilitar datos sobre ventas, valores de sus productos... en definitiva datos económicos sobre sus explotaciones, no obstante, alguna información puede ser considerada de utilidad. Así por ejemplo, desconocemos el número medio de animales que se vende anualmente por explotación, sin embargo sabemos que un 74% se destina indistintamente tanto a comercio nacional como internacional, el resto se comercializa en el mercado interior principalmente. Nuestros mejores clientes son los países de la Unión Europea seguidos por Estados Unidos, Canadá, Australia, México y otros de menor entidad como Costa Rica, Colombia, etc.

El producto a exportar no siempre es el mejor y siendo por este orden: negro, castaño y tordo las capas que tienen mayor aceptación internacionalmente. Respecto a la edad de los caballos destinados a exportación oscila entre los 3 y 6 años y el valor medio se cifra entre los 6000 y 24000 euros. Estamos por tanto ante animales que alcanzan un valor considerable en el mercado internacional, sin embargo, la Piroplasmosis Equina representa un freno a la exportación para el 51,8% de los ganaderos encuestados, siendo considerado por el 40,7 % como un problema mayor. Éste deriva de la obtención de licencias para el comercio, tratamientos, prevención y a veces por la mortalidad ocasionada. En la mayoría de los casos desconocemos la cuantía de estas pérdidas aunque una minoría las cifra entre 9000 y 18000 euros. A pesar de ello, solo el 14,8% considera a esta enfermedad causante de pérdidas económicas superiores a las que originan otros procesos infectocontagiosos, entre estos cabe destacar: Arteritis Vírica e Influenza, pensamos que en esta cuestión se ha antepuesto la salud animal al aspecto económico.

Un dato a tener en cuenta es que tan solo el 14,8% de los ganaderos han sufrido el rechazo comercial de sus animales por Piroplasmosis, suponemos que esto se debe a que la gran mayoría realizan diagnósticos antes de efectuar la venta, no asumiendo riesgos innecesarios tal y como ocurría en un pasado no muy lejano.

Por último, la respuesta es bastante unánime acerca de la falta de sensibilidad por parte de la administración ante el problema, no recibiendo en la mayoría de los casos el apoyo necesario. El sector reclama mayor atención por parte de las administraciones, aunque se hayan emprendido tímidos intentos de potenciar la investigación epidemiológica, promover el asesoramiento y establecer ciertos planes de lucha. Los ganaderos desconocen en su totalidad las medidas a adoptar para tratar de controlar la situación, lo cual era de esperar pues realmente ése no es su cometido sino el de los investigadores y profesionales veterinarios quienes con el apoyo de las administraciones deben trabajar en equipo para tratar de paliar pérdidas y controlar este proceso.

CONTROL Y LEGISLACIÓN

Cabe destacar por último, que aproximadamente 120 millones de équidos se encuentran expuestos a la piroplasmosis y sólo el 10% de la población mundial habita zonas libres de enfermedad. Los deportes ecuestres, el comercio de équidos y la rapidez de los transportes, propician la difusión y establecimiento de los vectores infectados en zonas distantes.

El control deberemos basarlo en:

- Medidas de manejo, especialmente en épocas de riesgos.
- Lucha química contra las garrapatas.
- Quimioprevención, igualmente, en épocas de máxima actividad de las garrapatas vectores.

La Ley de Epizootias y el Código Zoosanitario Internacional disponen de articulado específico para la piroplasmosis equina, si bien es la reglamentación internacional la más estricta, pues limita los movimientos de équidos enfermos y portadores asintomáticos a determinados países importadores. En este sentido, especifica la necesidad de acompañar un Certificado Zoosanitario Internacional donde se indique:

- Ausencia de signos clínicos el día del embarque.
- Seronegatividad (IFI,RFC) 30 días antes del embarque.

- Realización del tratamiento con ixodicidas 7 días antes del embarque.

Algunos países pueden restringir las importaciones a los periodos de inactividad de garrapatas. Por otra parte, esta reglamentación internacional (CZI), recoge artículos referidos a la importación temporal de caballos de competición seropositivos. Para éstos exige:

- Pasaporte (carta genealógica).
- Certificado Zoosanitario Internacional donde se especifiquen: Ausencia de signos clínicos y tratamiento con ixodicidas 7 días antes del embarque.

La autoridad veterinaria del país de destino, velará por la permanencia de estos animales en áreas bajo control de garrapatas y realizará exámenes periodicos para verificar la ausencia de éstas.

En síntesis y a modo de conclusión podemos señalar a esta enfermedad como causa de graves pérdidas económicas derivadas de las limitaciones de exportación de nuestro PRE a países comercialmente interesantes (USA, Japón, Canadá, etc) y que por tanto impiden la entrada a nuestros productos.

Por todo ello resulta recomendable avanzar en los siguientes aspectos:

- Completar estudios epidemiológicos.
- Determinar los vectores de la enfermedad.
- Valorar pérdidas.
- Desarrollar modelos experimentales.
- Avanzar en el diagnóstico.
- Investigar terapia eficaz contra *T.equi* (*therapia sterilisans magna*).
- Avanzar en el desarrollo de vacunas.

La puesta en práctica de medidas preventivas como el chequeo serológico para detección de portadores, los tratamientos con acaricidas, la quimioprevención y la aplicación de cuarentenas, tal y como recomienda el Código Zoosanitario Internacional, son aceptables medidas para impedir la difusión de la enfermedad a zonas libres. Los avances obtenidos en la vacunación contra otras especies de *Babesia* y *Theileria*, posiblemente tengan, en breve, aplicación en Piroplasmosis Equina.

Nuestra administración debería ser sensible ante este problema y potenciar la investigación en este campo, además de desarrollar planes (previo análisis costo/beneficio), que ayudará a reducir pérdidas y en un futuro a controlar esta enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

- ALMARZA HERRANZ, N., 1934. Sobre la diferenciación de *Piroplasma caballi* y *Nuttalia equi*. Rev. Hig. San. Pec., 24, pp. 247-264.
- BUESO GOMEZ, J., 1944. Contribución al conocimiento de algunas piroplasmosis poco descritas en España. Not. Neosan, 16, pp. 5-17.
- CARVALO-VARELA, M.; MARCOS, M.V.M.; PEREIRA DA FONSECA, J.M.; MADEIRA DE CARVALO, L.M.; CASTELO-BRANCO, A. y SABINO SERRA, J.M., 1989. Primeiros resultados do estudo epidemiológico das parasitoses dos equideos do Ribatejo. Comunicación personal.
- CORDERO DEL CAMPILLO y col., 1980. Índice Catálogo de Zooparasitos Ibéricos. Ed. por Ministerio de Sanidad y Seguridad Social. Madrid.
- DORCHIES, P.H., 1976. Piroplasmoses equines latentes. A propos de l'incident de Montreal. Rev. Med. Vet., 127 (11), pp. 1523-1528.
- D'OLIVEIRA, C.; WEIDE, V. A. M.; HABELA, M. A.; JACQUIET, P. y JONGEJAN, F. (1995).- Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. J. Clinic. Microbiol., 33(10), 2665-2669.
- FIGUEROA, J. V.; CHIEVES, L. P.; JOHNSON, G. S.; GOFF, W. L. y BUENING, G. M. (1994).- Ensayo diagnóstico basado en la reacción de polimerasa en cadena para detectar ganado infectado crónicamente con *Babesia bovis*. Rev. Latino Americana Microbiol., 36, 47-55.
- FRIEDHOFF, K.T., 1982. Piroplasms of Horse. Impact on International horse trade. Berl. Munch. Tierarztl. Wschr., 95, 368-374.
- GONZÁLEZ SEVILLA, R. 2005 Epidemiología de la piroplasmosis equina en el caballo de pura raza española en Extremadura.. Tesina de Licenciatura pp 149.
- GONZÁLEZ SEVILLA, R. 2004 *Theileria equi*: Aislamiento, cultivo "in vitro" y transmisión experimental vía endovenosa y a través de *Rhipicephalus bursa* en équidos susceptibles. Memoria Diploma Estudios Avanzados. pp 66.
- HABELA, M.; REINA, D.; NIETO, C.G.; VERDUGO, S.G. y NAVARRETE, I., 1989. Epidemiología de la babesiosis equina en Extremadura: estudio preliminar. Med. Vet., 6 (1), pp. 31-39.
- HABELA, M.A., GRAGERA-SLIKKER, A., MORENO, A. MONTES, G., SEVILLA, R., 2005. Piroplasmosis equina: conocimiento y grado de concienciación de los productores de caballos Pura Raza Española, Equinus 11, 17-34,

- HABELA, M.A., GRAGERA-SLIKKER, A., MORENO, A. MONTES, G., SEVILLA, R., 2005. Aportaciones al conocimiento de las especies de garrapatas de los équidos y su distribución en España, *Equinus* 13, 9-27,
- NOWLES, R.C.; MATHIS, R.M.; BRYANT, J.E. y WILLERS, K.H., 1966. Equine Piroplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 148, pp. 407-410.
- KUTTLER, K.L., 1981. Chemotherapy of Babesiosis: A review. En *Babesiosis*. Ed. por M. Ristic y J.P. Kreier. Academic Press Inc. New York, pp. 65-85.
- KUTTLER, K.L., 1988. World wide impact of Babesiosis. En *Babesiosis of domestic animals and man*. Ed. por M. Ristic. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. pp. 1-22.
- KUTTLER, K.L.; ZAUGG, J.L. y GIPSON, C.A., 1987. Imidocarb and parvaquone in the treatment of Piroplasmosis (*Babesia equi*) in equids. *Am J. Vet. Res.*, 48 (11), pp. 1613-1616.
- LEVINE, N.D., 1985. Apicomplexa. The Piroplasms. En *Veterinary Protozoology*. Ed. por N.D. Levine. Iowa State University Press. Ames. pp. 291-328.
- MAHONEY, D.F.; WRIGHT, I.G.; FRERICHS, W.M.; GROENENDYK, S.; O'SULLIVAN, B.M.; ROBERTS, M.C. y WADDEELL, A.H., 1977. The identification of *Babesia equi* in Australia. *Aust. Vet. J.*, 53, pp. 461-464.
- MEHLHORN, H. y SCHEIN, E., 1984. The Piroplasms: life cycle and sexual stages. *Adv. Parasitol.*, 23, pp. 37-103.
- MONTES CORTES M.G. 2006 Estudio comparativo entre las técnicas de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) e inmunoenzimática (cELISA) en el diagnóstico de la Piroplasmosis Equina. Aportaciones a la seroepidemiología en Extremadura y Andalucía. Memoria Diploma Estudios Avanzados pp 77.
- PURNELL, R.E., 1981. Babesiosis in various hosts. En *Babesiosis*. Ed. por M. Ristic Y J.P. Kreier. Academic Press Inc., New York. pp. 25-63.
- SABINO SERRA, J.M., 1988. Contribuição para o estudo laboratorial das babesioses dos cavalos em Portugal. Dissertação para Concurso de Investigador Auxiliar. Laboratorio Nacional de Investigação Veterinaria. Lisboa.
- SCHEIN, E., 1988. Equine Babesiosis. En *Babesiosis of domestic animals and man*. Ed. por M. Ristic, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. pp. 197-225.
- ZAUGG, J.L. y LANE, V.M., 1989. Evaluation of buparvaquone as a treatment for equine babesiosis (*Babesia equi*). *Am. J. Vet. Res.*, 50 (5), pp. 782-785.
- ZAUGG, J.L., 1993. Buparvaquona in the treatment of equine piroplasmosis (*Babesia equi*) of european origin. *Equine Pract.*, 15 (1), pp. 19-22.