

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS CLÍNICAS VETERINARIAS

**DIFERENCIAS ENTRE LOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS EN CABALLOS
FINA SANGRE DE CARRERA SEROPOSITIVOS Y SERONEGATIVOS A *Babesia
caballi* Y *Theileria equi***

Memoria de Título presentada como parte de
los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO

JORDANA XIMENA ALONDRA CERÓN MIRANDA

VALDIVIA – CHILE

2017

PROFESOR PATROCINANTE

Ananda Müller Pereira

**PROFESOR
COPATROCINANTE**

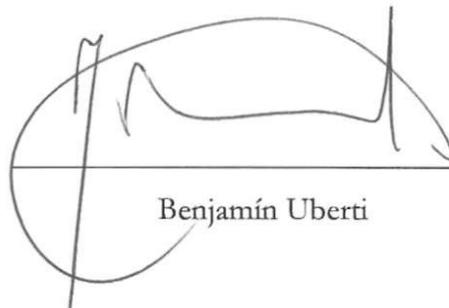


Pedro Bittencourt Velho

**PROFESORES
INFORMANTES**



Miguel Salgado Alfaro



Benjamín Uberti

FECHA DE APROBACIÓN: 25 de mayo de 2017

ÍNDICE

Capítulos	Página
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
5. RESULTADOS.....	12
6. DISCUSIÓN.....	15
7. REFERENCIAS.....	19

1. RESUMEN

Babesia caballi y *Theileria equi* son dos protozoos intra-eritrocitarios que afectan a caballos, mulas, burros y cebras. Ambos parásitos son los agentes causantes de la Piroplasmosis Equina, la cual se caracteriza por la presentación de una anemia hemolítica aguda. El objetivo de este estudio fue observar la diferencia entre la seropositividad a *B. caballi*, *T. equi* con los parámetros hematológicos en caballos Fina Sangre de Carrera, del Hipódromo Chile en Santiago.

Se tomaron muestras sanguíneas de 151 caballos Fina Sangre de Carrera que se encontraban en el Hipódromo Chile en Santiago, independiente del sexo, edad o estado de salud. Se realizó hemograma a todas las muestras en el Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria del Hospital Veterinario de la Universidad Austral de Chile y el suero fue utilizado para la detección de anticuerpos con el Kit ELISA Indirecto para el diagnóstico in vitro de *B. caballi* y *T. equi* (Inmunodot diagnósticos®). Con los resultados de ELISA, los animales fueron separados en dos grupos; seropositivos y seronegativos a Piroplasmosis Equina.

Un total de 18 caballos resultaron seropositivos a Piroplasmosis Equina, los cuales se desglosan en 15 caballos seropositivos a *B. caballi* 9 a *T. equi* y 6 co-expuestos, obteniendo por lo tanto una seropositividad de 10%, 6% y 4% respectivamente. Se observó diferencia estadísticamente significativa en las proteínas totales plasmáticas del hemograma de los animales seropositivos a la Piroplasmosis Equina, las cuales se encontraban dentro del rango de referencia, pero en mayor concentración que aquella descrita en los animales seronegativos. Estos resultados pueden deberse a la forma de presentación de la Piroplasmosis Equina, atribuido a la fase crónica de la enfermedad, donde se observan cambios mínimos en el hemograma.

En conclusión, la frecuencia de seropositividad a *B. caballi* fue mayor a la de *T. equi*. La seropositividad a Piroplasmosis Equina se relacionó a mayores concentraciones de proteínas plasmáticas totales, sin embargo, no estuvo asociada a cambios en eritrograma, leucograma o recuento de plaquetas.

Palabras clave: caballos, piroplasmosis equina, serología, hematología.

2. SUMMARY

DIFFERENCES BETWEEN HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN THOROUGHBRED RACING FINE HORSES SEROPOSITIVES AND SERONEGATIVES TO *Babesia caballi* AND *Theileria equi*

Babesia caballi and *Theileria equi* are two intra-erythrocyte protozoa that affect horses, mules, donkeys and zebras. Both parasites are the agents of equine piroplasmosis disease, which is characterized by the presentation of an acute hemolytic anemia. The aim of this study was to determine the differences between seropositivity to *B. caballi*, *T. equi* and haematological parameters in Thoroughbred Racing Fine horses, from Hipódromo Chile racecourse in Santiago.

Blood samples from 151 Thoroughbred Racing Fine horses were taken at the Hipódromo Chile racecourse in Santiago, regardless of gender, age or health status. Complete blood count (CBC) was performed on all samples at the Veterinary Clinical Pathology Laboratory of the Veterinary Hospital of the Universidad Austral de Chile. The serum was used for the detection of antibodies with the Indirect ELISA Kit for the *in vitro* diagnosis of *B. caballi* and *T. equi* (Immunodot diagnostics®). Animals were separated into two groups according to ELISA results; Seropositive and seronegative to Equine Piroplasmosis.

18 horses were seropositive to Equine Piroplasmosis, which divide into 15 horses seropositive to *B. caballi*, 9 to *T. equi* and 6 co-exposed, thus obtaining a seropositivity of 10%, 6% and 4% respectively. A statistically significant difference observed in the total plasma proteins of the CBCs from the seropositive group, which was within the reference range, but in a higher concentration than that described in seronegative animals. These results may be due to the presentation of Equine Piroplasmosis, attributed to the chronic phase of the disease, where minimal changes in CBCs are observed.

In conclusion, the frequency of seropositivity to *B. caballi* was greater than *T. equi*. The seropositivity to Equine Piroplasmosis was related to higher concentrations of total plasma proteins, however, it was not associated to changes in erythrogram, leukogram or platelet count.

Key words: horses, equine piroplasmosis, serology, hematology.

3. ANTECEDENTES

Babesia caballi y *Theileria equi* son dos protozoos intra-eritrocitarios causantes de la babesiosis y theileriosis equina (Acici y col 2008), enfermedades que en conjunto también son conocidas como Piroplasmosis Equina. Pueden ser transmitidas por garrapatas o de forma iatrogénica (Wise y col 2014), siendo capaces de infectar caballos, mulas, burros y cebras, caracterizándose clínicamente por una anemia hemolítica aguda (Rothschild y col 2013).

La Piroplasmosis es una enfermedad de notificación obligatoria a la Organización mundial de sanidad animal (OIE 2010) y al Servicio Agrícola y Ganadero (SAG 2014), por ser una de las principales restricciones internacionales para la movilización de los equinos (Rothschild y col 2013). Su ingreso a un país no endémico es de alto riesgo, debido a la amplia distribución de las garrapatas vectores (Abdullah y col 2014).

3.1. SITUACIÓN EN CHILE

En 1971 Rudolph describió por primera vez en Chile la Piroplasmosis Equina en caballos Fina Sangre provenientes del Hipódromo Chile, utilizando la técnica de frotis sanguíneo (Rudolph 1971). Luego de esto, se ha seguido reportando animales positivos para *B. caballi* y *T. equi*, a través de estudios que utilizan como técnicas diagnósticas principalmente la serología (Campano 1991, Ausset 1999, Ernst 1999, Terroba 2009) y técnicas moleculares (Vargas y col 2004).

En Chile, los animales afectados con Piroplasmosis Equina presentan un cuadro leve que generalmente pasa inadvertido (Ernest 1999). Los caballos seropositivos corresponden a equinos Fina Sangre de Carrera en actividades de carrera, ecuestre (salto) y polo, no se ha encontrado seropositividad en mestizos o criollos (Campano 1991).

Por otra parte, se ha descrito la presencia de especies de garrapatas que pueden actuar como vector biológico de estos hemoparásitos en Chile, tales como; *Rhipicephalus sanguineus* y *Amblyomma tigrinum* (González y col 2006). Sin embargo, se considera la transmisión iatrogénica a través del uso de jeringas, transfusiones sanguíneas u otros instrumentos contaminados, la principal vía de infección de los caballos en el país (Campano 1991).

Hasta la fecha en Chile, diversos estudios serológicos han detectado anticuerpos contra *B. caballi* y *T. equi* en equinos (Cuadro 1), sin embargo, en ninguno se relaciona la seropositividad con las alteraciones laboratoriales, por lo que se hace necesario actualizar la información por la importancia sanitaria y económica de esta enfermedad para la industria equina nacional.

Cuadro 1. Estudios de frecuencia de exposición a *Babesia caballi* y *Theileria equi* en equinos, desde el año 1973 al 2008 en Chile. (Campano 1991, Ausset 1999, Ernst 1999, Vargas y col 2004, Terroba 2009.)

Estudio	Agente	Muestras positivas (%)	N	Raza equino	Técnica de detección
Provincia de Santiago (1973)	B. <i>caballi</i>	0	SR	Mestizo	Fijación de Complemento
	<i>T. equi</i>	0	SR	Mestizo	
Provincia de Santiago (1973)	B. <i>caballi</i>	2	180	Fina Sangre	Fijación de Complemento
	<i>T. equi</i>	96	180	Fina Sangre	
Hipódromo de Chile (1977)	<i>T. equi</i>	43,9	164	Fina Sangre	Serología
Hipódromo de Chile (1977)	<i>T. equi</i>	39,9	2113	Fina Sangre	Serología
Hipódromos nacionales (1978)	<i>T. equi</i>	43,4	SR	Fina Sangre	Fijación de Complemento
SAG (1985-1990)	<i>T. equi</i>	3,82	2278	Fina Sangre	AGID
SAG (1985-1990)	<i>T. equi</i>	0,1	740	Criollo-Mestizo	AGID
Región Metropolitana y Valparaíso (1999)	B. <i>caballi</i>	0	150	Fina Sangre	Fijación de Complemento
	<i>T. equi</i>	6			
Hipódromo de Chile (1999)	B. <i>caballi</i>	0	250	Fina Sangre	Fijación de Complemento
	<i>T. equi</i>	1,2			
Región Metropolitana (2004)	B. <i>caballi</i>	1,2	77	SR	PCR
	<i>T. equi</i>	19			
Valparaíso Sporting Club (2005)	<i>T. equi</i>	42	100	Fina Sangre	IFI
Hipódromo de Chile (2008)	<i>T. equi</i>	22	100	Fina Sangre	IFI

n= número de animales en cada estudio; AGID= Inmunodifusión en gel agar; IFI= Inmunofluorescencia indirecta; PCR= Reacción en cadena de la polimerasa; SR= Sin registro.

3.2. ETIOLOGÍA

Los géneros *Babesia* y *Theileria*, pertenecen a las familias Babesiidae y Theileriidae respectivamente, las cuales se agrupan en el orden Piroplasma y en el filo Apicomplexa

(Rothschild 2013). Son hemoparásitos intro-eritrocitarios obligados (Wise y col 2014). El nombre que recibe la enfermedad; “Piroplasmosis”, deriva de la apariencia de pera que presentan sus formas replicativas intraeritrocitarias (Bartolomé Del Pino 2016).

La taxonomía de los agentes causales de piroplasmosis ha estado en discusión desde su descubrimiento, de ahí que *Babesia equi* fue reclasificada a *T. equi* en el 1998 (Mehlhorn y col 1998), dado que *T. equi* a diferencia de *B. caballi*, posee una fase pre eritrocítica en el huésped vertebrado, que usualmente ocurre en un leucocito (Schein y col 1981).

3.3. CICLO DE VIDA Y TRANSMISIÓN

3.3.1 Ciclo de Vida en la Garrapata

El ciclo de vida de las garrapatas incluye cuatro etapas (huevo, larva, ninfa y adulto) y la transmisión del parásito puede ocurrir de tres formas distintas; intraestadial, transestadial y transovárica (Wise y col 2013). Los eventos de transmisión específicos para *B. caballi* y *T. equi* varían de una especie de garrapata a otra.

Babesia caballi posee transmisión transovárica, persistiendo a través de diferentes generaciones en las garrapatas (Mehlhorn 1998).

Theileria equi tiene al caballo como único reservorio, sin embargo, debido a la longevidad y a la mortalidad de las garrapatas machos, estas pueden transmitir a *T. equi* a múltiples caballos (Rothschild 2013).

3.3.2 Transmisión

La transmisión de *B. caballi* y *T. equi* puede ocurrir a través de una garrapata infectada o por transferencia iatrogénica de sangre, tanto por el uso de material contaminado (agujas u instrumentos quirúrgicos) como por la realización de transfusiones de sangre provenientes de un donador infectado (Pelzel y col 2015). Los animales infectados pueden permanecer como portadores por largos periodos de tiempo (Salim y col 2013).

B. caballi y *T. equi* comparten la mayoría de las garrapatas vectores, las cuales generalmente están presentes en la misma región geográfica y frecuentemente co-infectan a los caballos. Existen más de 15 especies que transmiten a estos protozoos, las cuales son representantes de los géneros; *Dermacentor*, *Hyalomma* y *Rhipicephalus* (Friedhoff y col 1990). *T. equi* puede además ser transmitida por *Boophilus microplus* y *Amblyomma cajennense* (Rothschild 2013).

3.3.3 Ciclo de Vida en el Caballo

El ciclo de vida de *B. caballi*, es similar al de las demás especies dentro del género, donde la transmisión comienza con la alimentación de una garrapata infectada (De Waal 1990). La garrapata inculca los esporozoitos que invaden los eritrocitos y se transforman allí en trofozoitos

(Rothschild 2013), estos crecen y se dividen en dos merozoitos redondos, ovales o piriformes. Los merozoitos son capaces de infectar nuevos eritrocitos, ya que se reproducen asexualmente y esto conduce a la ruptura de los eritrocitos, que a su vez permite que los merozoitos sean liberados a la circulación para invadir otros eritrocitos (Wise y col 2014).

En el caso de *T. equi*, las garrapatas infectadas se alimentan de caballos e inoculan a través de su saliva los esporozoitos de *T. equi*, los cuales una vez dentro del torrente sanguíneo pueden invadir linfocitos T, B, monocitos y macrófagos (Ramsay col 2013), donde son capaces de desarrollar los microesquizontes y macroesquizontes, que luego, tras una reproducción asexual producirán merozoitos, los cuales serán liberados para invadir los eritrocitos (Rothschild 2013). Una vez dentro de los eritrocitos, los merozoitos se reproducen por fisión binaria, causando la ruptura del eritrocito infectado, de esta forma, se expande la población de merozoitos y la cantidad de eritrocitos parasitados (Mehlhorn y col 1998). Cuando se produce la ingestión de un merozoito (y/o de un gameto) por una garrapata, el parásito se reproduce sexualmente y los gametos se combinan para formar el cigoto dentro del intestino medio de la garrapata. Continuando con el desarrollo, aparecen los esporoblastos dentro de las glándulas salivales de la garrapata y la producción de los esporocitos infectivos en la saliva (Guimaraes y col 1998).

3.4. SIGNOS CLÍNICOS

En general las infecciones con *T. equi* suelen ser más severas que las causadas por *B. caballi*, aun así, los signos y la severidad pueden variar significativamente de una región a otra (Wise y col 2014). Los casos agudos de piroplasmosis equina están caracterizados por presentar pirexia, anorexia moderada, decúbito, deshidratación, membranas mucosas congestivas, taquicardia, taquipnea, sudoración y edema de las extremidades, en cambio cuando la enfermedad se manifiesta de manera hiper aguda, nos encontramos con un inicio fulminante de los signos clínicos con o sin colapso (Zobba y col 2008).

Los caballos con piroplasmosis crónica se manifiestan con una serie de signos clínicos inespecíficos; inapetencia, bajo rendimiento, pérdida de peso, pobre condición corporal, letargia y en algunos casos pueden presentar anemia leve (Friedhoff y col 1990).

3.5. DIAGNOSTICO

La sospecha de piroplasmosis equina se puede basar en los signos clínicos, sin embargo, por ser poco específicos y por la existencia de una gran cantidad de diagnósticos diferenciales para la enfermedad (Rothschild 2013), es necesario aplicar otras modalidades para el diagnóstico definitivo (Wise y col 2014).

3.5.1. Microscopía óptica

La microscopia puede ser utilizada para identificar a los organismos dentro de los eritrocitos en frotis sanguíneos teñidos durante la fase aguda de la infección (Bashiruddim y col, 1999), en cambio, en la fase crónica o en los portadores inaparentes, tiene baja sensibilidad, debido a que existe un bajo número de piroplasmas presentes en la circulación (Friedhoff y col 1990).

3.5.2. Pruebas serológicas

3.5.2.1. Fijación del complemento (CFT). Es una prueba muy específica, aunque aún carece de sensibilidad en fases crónicas o inaparentes de la infección, mayoritariamente porque algunos anticuerpos producidos en estas fases no se fijan con el complemento (IgGT) (Cunha y col 2006).

3.5.2.2. Test de inmunofluorescencia indirecta por anticuerpos (IFAT). En este ensayo, los antígenos del parásito están pegados a un portaobjeto de vidrio, listos para reaccionar al suero equino, los anticuerpos marcados con fluoresceína que se peguen serán visibles bajo la luz ultravioleta (Weiland y col 1986).

3.5.2.3. Ensayo de inmunoabsorción enzimática por competencia (cELISA). Esta prueba es considerada más sensible para cuadros subclínicos, que presentan una baja parasitemia. Se caracteriza por presentar un mejor rendimiento comparado con las pruebas CFT e IFAT (Kappmeyer y col 1999). En el 2004 la OIE aprobó el cELISA como la prueba recomendada tanto para el transporte internacional de caballos (Rothschild 2013) como para identificar a los portadores (Vieira y col, 2013).

3.5.3. Técnicas moleculares

3.5.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se basa en la amplificación y detección del DNA del parásito aislado de sangre periférica de un caballo infectado y se caracteriza por ser una prueba exquisitamente sensible y específica (Nicolaiewsky y col 2001). Esta técnica es capaz de detectar niveles de parasitemia tan bajos como 0,0083% para *T. equi* y 0,017% para *B. caballi* (Bashiruddim y col, 1999), por lo que resulta ideal para la detección de portadores inaparentes (Rampersad y col, 2003). Es probable que en un futuro próximo se estandarice la PCR comercialmente para la detección de *B. caballi* y *T. equi* (Wise y col 2014).

3.6. HALLAZGOS HEMATOLÓGICOS

En los caballos con Piroplasmosis equina aguda, se puede observar alteraciones laboratoriales asociadas a cambios hematológicos, donde principalmente encontramos anemia con disminución del volumen globular aglomerado (VGA), la hemoglobina y los eritrocitos (Zobba y col 2008). Es frecuente encontrar monocitosis, eosinopenia, linfopenia, neutropenia con desvío a la izquierda e hiperfibrinogenemia. Se puede observar trombocitopenia y, en casos severos, plasma ictérico (raro en infecciones por *B. caballi*) (Wise y col 2014).

En cuadros con duración mayor a 10 días post infección, puede presentarse linfocitosis y anisocitosis eritrocitaria (Rothschild 2013). La anemia puede ser mínima o estar ausente en la fase crónica de la enfermedad (Pelzel-Mccluskey y col 2015). A su vez, el leucograma y las concentraciones de fibrinógeno pueden variar dependiendo de la severidad y la etapa en que se encuentre la infección (Rudolph y col 1975).

3.7. HIPÓTESIS

Existirían diferencias entre los parámetros del hemograma de caballos seropositivos y seronegativos a Piroplasmosis Equina.

3.8. OBJETIVOS

3.8.1. Objetivo general

Identificar las diferencias entre los valores hematológicos de caballos seropositivos y seronegativos a Piroplasmosis Equina

3.8.2. Objetivos específicos

Determinar la frecuencia de exposición a *Babesia caballi* y *Theileria equi* en caballos Fina Sangre de Carrera.

Comparar los resultados del hemograma de Caballos Fina Sangre de Carrera con serología positiva y negativa a *Babesia caballi* y *Theileria equi*.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Material biológico

4.1.1.1. Cálculo del tamaño muestral: Se realizó un promedio de la seroprevalencia observada en los estudios en Chile desde el 1990 hasta la fecha, donde se obtuvo un promedio de un 13% de prevalencia para la Piroplasmosis Equina, por lo que se estimó una frecuencia de exposición cercana al 10% para *B. caballi* y *T. equi*. El tamaño muestral fue calculado utilizando un nivel de confianza de 95% y un error de 5%, mediante la fórmula matemática de Thrusfield (2007):

$$n = \frac{Z^2 pq}{e^2}$$

En donde:

- n: Tamaño mínimo de muestra.
- Z: Nivel de confianza (95%).
- p: Proporción de animales seropositivos.
- q: Proporción de animales seronegativos.
- e: Precisión (5%).

Al reemplazar:

$$n = \frac{1,96^2 * 0,1 * 0,9}{0,05^2} = 139.$$

Por lo tanto, el tamaño muestral necesario fue de 139 caballos. Finalmente, para este estudio se incluyeron un total de 151 caballos Fina Sangre de Carrera, que se encontraban disponibles para muestreo en el Hipódromo Chile en Santiago, independiente de sexo, edad o estado de salud. Un consentimiento fue firmado por el propietario, preparador o petisero antes de realizar cualquier procedimiento.

4.1.2. Equipos y reactivos de laboratorio

- Contador hematológico automatizado (Sysmex® KX 21 N).
- Centrífuga (Thermo Scientific Heraeus Pico 17).
- Horno Incubadora (Chicago Surgical and Electrical, Division of labline, inc).
- Lector de micro placa de ELISA (ARQUIMED innovación®).

- Kits ELISA Indirecto para el diagnóstico in vitro de *Babesia caballi* y *Theileria equi* (Inmunodot diagnósticos®).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Toma de muestra

Se utilizaron agujas 21G y jeringas de 5 mL, para extraer 3 mL de sangre de la vena yugular de los caballos. Las muestras se almacenaron en tubos con anticoagulante ácido etildiamino tetracético (EDTA) y en tubos sin preservantes, se refrigeraron a 4°C y fueron enviados al Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria de la Universidad Austral de Chile (UACh). La sangre total fue utilizada para realización del hemograma con un máximo de 12h desde la toma de muestras. Las muestras sin anticoagulante fueron centrifugadas para separación del suero, el cual fue congelado a -20°C hasta su lectura en ELISA indirecto.

4.2.2. Análisis de muestra

4.2.2.1. Hemograma. Con un contador hematológico automatizado KX-21N (Sysmex®, Japón), se midieron las concentraciones de hemoglobina y se realizaron los recuentos de eritrocitos, leucocitos y plaquetas. El Volumen Globular Aglomerado (VGA) fue determinado por centrifugación en tubos de microhematocrito durante 5 minutos a 16000 g. El volumen corpuscular medio (VCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) fueron calculados empleando los resultados del recuento de eritrocitos, concentración de hemoglobina y VGA (Thrall 2004).

Para la realización del recuento diferencial de leucocitos los frotis sanguíneos fueron teñidos con tinción rápida (Hemacolor, Merck®) y observados por microscopía óptica de inmersión. Las proteínas totales fueron medidas por el índice de refracción a través del refractómetro.

El fibrinógeno se obtuvo a través de la prueba de precipitación por calor, sometiendo el tubo de microhematocrito a 56°C por 3 minutos en una estufa (Chicago Surgical and Eletrical).

4.2.2.2. ELISA Indirecto. Para la realización de esta prueba se utilizó un kit de ELISA Indirecto para el diagnóstico in vitro de *Babesia caballi* y *Theileria equi* (Inmunodot diagnósticos®). Se siguieron las indicaciones del fabricante, por lo que se comenzó separando el suero de obtenido de cada caballo en el Hipódromo Chile, con la centrífuga a 13.000 G por 3 minutos y luego se utilizaron 100 µL de suero diluidos (1:100) en PBS Tween-80, sobre los micro platillos del kit ELISA, lo cual fue posteriormente incubado por 1 hora en una estufa de cámara húmeda a 37° C.

Terminado este ciclo, se procedió a lavar las placas tres veces con PBS-Tween 80 para luego adicionar 100 µL de conjugado (anti IgG de equino) y volver a incubar por 1 hora en una estufa de cámara húmeda a 37° C. Finalizada la incubación, se volvió a lavar los micro platillos, se les

agregó 100 μ L de sustrato (p-nitrofenil fosfato) y se dejaron a temperatura ambiente por 45 minutos para poder hacer la lectura de la placa con un lector de micro placa de ELISA (ARQUIMED innovación®).

La interpretación del ELISA indirecto se realizó estableciendo un índice de corte (I.C.) utilizando la medida de la densidad óptica (D.O) del suero control negativo, multiplicado por el factor 2,5. Las muestras que presentaron una coloración amarilla intensa y una D.O igual o mayor que el I.C., fueron consideradas positivas para *B. caballi* y/o *T. equi* según corresponda. Las muestras que no presentaron coloración amarilla intensa y D.O menor que el I.C., fueron consideradas negativas para *B. caballi* y/o *T. equi* según corresponda.

4.2.3. Análisis Estadístico

Los resultados a la prueba de ELISA fueron ingresados a una planilla de Microsoft Excel 2010, donde los animales fueron separados en dos grupos; seropositivos y seronegativos a Piroplasmosis Equina (*B. Caballi* y *T. equi*).

Posteriormente los datos ingresados a la planilla Excel fueron importados al programa estadístico StataMP13 (StataCorp College Station, Texas®), donde se le aplicó el Test de Shapiro-Wilk a todos los valores para establecer la normalidad de los datos. Los datos normales fueron analizados mediante Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, el cual representa una de las pruebas más utilizada para probar hipótesis sobre diferencias entre dos o más grupos (Kaps y col 2004). Se utilizó como modelo estadístico de Análisis de Varianza de una vía:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Dónde:

μ = corresponde a la media general.

T_i = el efecto del status serológico a Piroplasmosis Equina.

e_{ij} = valor residual de las variantes.

Mientras tanto, los datos no normales fueron analizados mediante la prueba U de Mann-Whitney para determinar diferencias entre los dos grupos. Se consideró un nivel de significancia de $P < 0,05$ e intervalo de confianza (IC) de 95%.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

5.1.1. Frecuencia de exposición a *Babesia caballi*, *Theileria equi* y co-exposición.

Un total de 15 caballos resultaron positivos a *Babesia caballi*, 9 a *Theileria equi* y 6 caballos presentaron co-exposición, obteniendo un porcentaje de 10%, 6% y 4% respectivamente, de un total de 151 animales muestreados.

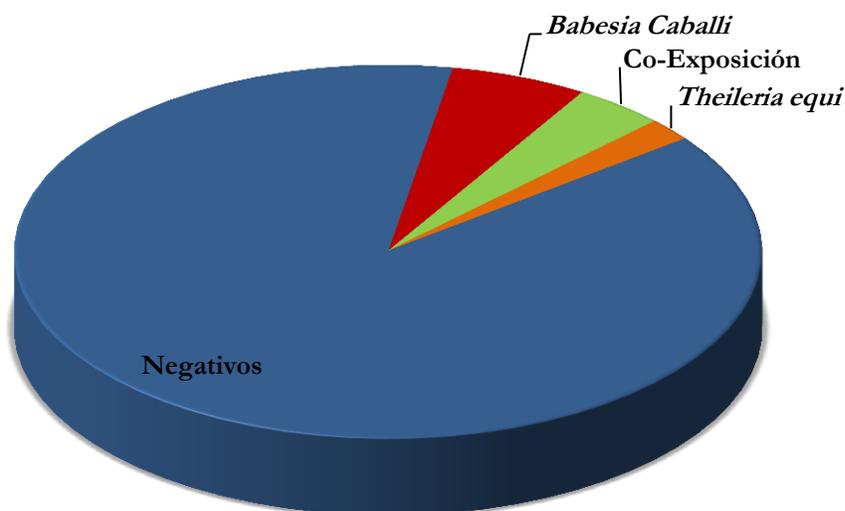


Figura 1. Frecuencia de exposición a *Babesia caballi*, *Theileria equi* y co-exposición en Caballos Fina Sangre de Carrera del Hipódromo Chile, Santiago.

5.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.2.1. Relación entre la seropositividad a piroplasmosis equina sobre los valores hematológicos.

De acuerdo al test Shapiro-Wilk, los datos referentes a eritrocitos, VGA, hemoglobina, leucocitos y neutrófilos presentaron una distribución normal, mientras que el VCM, CHCM, eosinófilos, baciliformes, linfocitos, monocitos, plaquetas, proteínas y fibrinógeno resultaron de distribución no normal.

Los resultados del ANOVA para los valores de hemograma con distribución normal, se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Resultado del test ANOVA para los parámetros normales del hemograma de caballos seropositivos y seronegativos a los agentes *Babesia caballi* y/o *Theileria equi*.

Valores hematológicos	Seropositivos		Seronegativos			Valor P
	Media	+DE	Media	+DE	IR	
Eritrocitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	10,25	1,21	9,79	1,01	6,6-11,4	0,0818
VGA (%)	44	3,95	42	4,28	32-50	0,0823
Hemoglobina (g/L)	155	16,7	147	16,24	110-178	0,0601
Leucocitos $\times 10^3$ (células/ μL)	9694	1916	9068	1846	5-11	0,1810
Neutrófilos $\times 10^3$ (células/ μL)	5718	1435	5540	1706	2,2-6,	0,6742

DE= Desviación estándar; IR= Intervalo de referencia; Valor $p \leq 0,05$, VGA= Volumen corpuscular aglomerado.

Se observó que ninguno de los valores hematológicos del cuadro 2 presentó diferencias significativas entre animales seropositivos y seronegativos a *Babesia caballi* y/o *Theileria equi*.

En el Cuadro 3 se presentan los resultados de los valores del hemograma evaluados por la prueba de U de Mann-Whitney.

Cuadro 3. Resultados de la prueba U de Mann-Whitney para los valores no normales del hemograma de caballos seropositivos y seronegativos a los agentes *Babesia caballi* y/o *Theileria equi*.

Valores hematológicos	Seropositivos		Seronegativos		IR	Valor P
	Mediana	RI	Mediana	RI		
VCM (fL)	43,269	3,008	43,225	1,821	37-54	0,6234
CHCM (g/L)	350,690	9,722	348,160	10,591	320-380	0,3936
Eosinófilos (células/uL)	132,555	270	116,007	194	100-800	0,9201
Baciliformes células/uL)	32,333	0	25,661	0	0	0,7662
Linfocitos ($\times 10^3$ células/uL)	3613,44	1682	3201,77	1410	1,5-6,5	0,1217
Monocitos (células/uL)	197,833	166	184,706	175	0-600	0,4043
Plaquetas ($\times 10^4$ células/uL)	119,812	37,5	120,963	34	9-20	0,9352
Proteínas Totales (g/L)	68,833	4	67,203	5	68-84	0,0412
Fibrinógeno (g/L)	2,722	1	2,338	2	<5	0,2080

RI= Rangos intercuartiles; IR= Intervalo de referencia; Valor $p \leq 0,05$, VCM= Volumen corpuscular medio; CHCM= Concentración de hemoglobina corpuscular media. Los resultados con valor $P \leq 0,05$ fueron destacados en negrita.

Se observó diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones de proteínas plasmáticas totales entre los caballos seropositivos y los seronegativos a *B. caballi* y/o *T. equi*. Los animales seropositivos presentaron valores de proteínas mayores que los animales seronegativos.

6. DISCUSIÓN

6.1. FRECUENCIA DE EXPOSICIÓN A *BABESIA CABALLI* Y *THEILERIA EQUI*

La Piroplasmosis Equina (PE), enfermedad que incluye a *B. caballii* y a *T. equi*, presentó una seropositividad de un 12% en este estudio. Se sospecha que la transmisión iatrogénica debería ser la principal vía de transmisión de los agentes, la cual puede ocurrir tanto por el uso de material contaminado (agujas u instrumentos quirúrgicos) como por la realización de transfusiones de sangre provenientes de un donador infectado (Pelzel y col 2015).

La frecuencia para *B. caballii* en este estudio fue de 10%, la cual es mayor a la descrita por Ernst (1999) en la Región Metropolitana y por Torres (2004) en la Región de Valparaíso, donde ambos obtuvieron una seropositividad de 0%, utilizando la técnica de fijación del complemento.

Esta alza para *B. caballii* se puede explicar por el incremento de la industria equina en el país. Según lo descrito por Pelzel-Mccluskey (2015), el incremento de la industria equina se asocia a un mayor movimiento de animales que provienen de países con alta prevalencia de la enfermedad y altas tasas de infestación por garrapatas de los géneros; *Dermacentor*, *Hyalomma* y *Rhipicephalus* (Friedhoff y col 1990), representando un potencial riesgo para la introducción de *B. caballii* en países no endémicos.

Steinman (2012) en estudios de epidemiología de la enfermedad, describe a; la raza y el tipo de manejo de los caballos, como dos importantes factores de riesgos para la Babesiosis. Por lo tanto, la población de caballos evaluados en este estudio se encontraba en un potencial riesgo a la exposición a *B. caballii*, debido a que recibían periódicamente tratamientos vía endovenosa, donde se presume que podría ocurrir la transmisión iatrogénica, por el inadecuado manejo de las agujas y jeringas (Auset 1999).

Si bien la seropositividad a *B. caballii* encontrada en este estudio es más alta que la reportada anteriormente, aún no llega a ser comparable con los países tropicales y subtropicales que están constantemente expuestos al agente patógeno, como Brasil, que presenta una seropositividad de 69,2% (Vierira y col 2013) según un estudio realizado en zonas rurales y urbanas del estado de Paraná.

Por otra parte, se observó una frecuencia de exposición de 6% a *T. equi*, lo cual concuerda con lo observado por Torres (2004) en la Región de Valparaíso con un 7% de muestras positivas a través de la fijación del complemento, pero presenta un menor porcentaje comparado con Terroba

(2009), quien reportó una prevalencia de 22% a *T. equi* en la Región Metropolitana. El presente estudio representaría una gran disminución en la frecuencia de exposición al agente. Esto último ha sido observado por Auset (1999), el cual describe una tendencia a bajar la seropositividad de *T. equi* en el país, esto puede ser atribuido según Ernst (1999) a las medidas que se han tomado en torno al manejo sanitario de estos animales y a la mejora en el diagnóstico de la enfermedad.

Con respecto a la co-exposición, se registró un 4% en este estudio, lo cual representa un alto porcentaje, donde la mayoría de los caballos seropositivos a *T. equi*, también lo eran para *B. caballi*. Esto concuerda con lo observado comúnmente en países endémicos, donde la co-exposición es frecuente debido a que ambos parásitos comparten la mayoría de las garrapatas vectores y suelen encontrarse en las mismas regiones geográficas (Rothschild 2013). Además, ambos agentes presentan la misma forma de transmisión iatrogénica (Bartolomé Del Pino 2016), lo que podría explicar la co-exposición encontrada en este estudio.

La mayor seropositividad de *B. caballi* por sobre *T. equi* encontrada en este estudio, difiere a lo reportado anteriormente en Chile (Campano 1991, Ernst 1999, Torres 2004 y Terroba 2009) y también a lo observado en; Italia (Bartolomé Del Pino 2016), México (Cantú-Martínez y col 2012) y Sudan (Salim y col 2013). Sin embargo, los resultados concuerdan con; Israel (Steinman y col 2012), Venezuela (Mujica y col 2011) y Brasil (Kerber y col 2009), los cuales presentan mayor seropositividad a *B. caballi*. Esta situación se puede explicar por la forma de transmisión de ambos parásitos, donde se ve favorecida la diseminación de *B. caballi*, gracias a la transmisión transovárica dentro de la garrapata que no ocurre en *T. equi*, agente que tiene como único reservorio al caballo (Rothschild 2013).

Asgarali (2007) y Wise (2014) además describen que existe una mayor o igual seropositividad para *B. caballi* en presencia de climas templados, mientras que *T. equi* se reporta más en los países endémicos; los cuales se encuentran en América central y del sur (a excepción de Argentina y Chile), Europa del Sur, Asia y África.

Por lo tanto, la presencia de estos agentes en el territorio Chileno se presume es debido al ingreso animales importados (*observación personal*), que provienen portadores desde países con alta prevalencia de PE, los cuales no son sometidos a las cuarentenas de vigilancia necesarias al ingresar al país. El uso de agujas compartidas, transfusiones de sangre u otro mal manejo (Wise y col 2014), podrían ser responsables por la inoculación de los agentes desde animales portadores a animales libres de la enfermedad, generando la frecuencia de exposición observada en este estudio.

6.2. RELACIÓN ENTRE LA PIROPLASMOSIS EQUINA Y LOS VALORES HEMATOLÓGICOS

Las proteínas totales, son representadas por las albuminas y las globulinas (α , β y γ), estas últimas forman parte del sistema inmune, mientras que las albuminas están encargadas de transportar sustancias y determinar la presión oncótica dentro de los vasos sanguíneos (Witter 1983). La mayor concentración de proteínas plasmáticas totales en los animales con Piroplasmosis Equina (PE) concuerda con lo descrito por Kumar (2002), quien registró que la concentración de proteínas totales incrementa en los caballos con PE. Esto es explicado por la deshidratación; principal causa de la letargia asociada a la enfermedad (Divers 1998) y por el alza de las γ -globulinas (Radostits y col 1999), las cuales suelen aumentar en las infecciones crónicas o en la inflamación con producción de anticuerpos (Muñoz y col 2010).

Así mismo, Barrera (2010) registró que los valores de proteínas totales para los caballos con PE, son significativamente más altos que en caballos libres de la enfermedad, y al analizarlo a través de la electroforesis en suero, observó que las albuminas y las γ -globulinas presentaban significativas alzas de sus valores totales en caballos con PE. Otros estudios (Mahmoud 2015, Youssef y col 2015 y Sumbria y col 2016) también observaron aumento de las globulinas en los animales con PE, lo cual se atribuye a la respuesta inmune crónica a los agentes. Tizar (1996) describe que los protozoos pueden activar la respuesta inmune tipo celular, sin embargo, el mecanismo inmunológico de la PE es mayoritariamente de naturaleza humoral (Morris y col 2002) que se activa por el parasitismo y esto es lo que explica el aumento en los valores de proteínas totales observado en los caballos con PE del Hipódromo de Chile.

Al contrario de esto, se ha registrado (Barrera y col 2010, Zobba y col 2008, Mahmoud 2015, Youssef y col 2015) la presencia de hipoproteinemia en animales con PE, la cual se asocia con la fase aguda de la infección, debido a la severa anorexia que caracteriza a la enfermedad (Barrera y col 2010). Además, Youssef (2015) describe que existe una disminución de las proteínas totales causada por la reducción de su síntesis en el hígado, como consecuencia de una posible hepatopatía desarrollada por la PE.

Las diferencias observadas en los resultados de los distintos estudios se pueden explicar por los tipos de presentación de la PE, los cuales pueden ser hiperagudo, agudo u crónico (Rothschild 2013). En los hemogramas de animales positivos a PE en la fase aguda de la enfermedad se observa anemia con disminución del volumen globular aglomerado, hemoglobina y eritrocitos (Wise y col 2014). Además, Mahmoud (2015) describe trombocitopenia en los caballos infectados.

Mientras tanto, en la fase crónica se representa un cuadro leve, donde la anemia puede ser mínima o estar ausente (Pelzel-Mccluskey y col 2015). Cunha (1998) registró que los animales en fase

crónica de la enfermedad no sufren alteraciones significativas en el hemograma, y esto concuerda con lo observado en el presente estudio.

Además, De Waal (1992) describe que luego de sobrevivir a la fase aguda de la enfermedad, los caballos pueden permanecer seropositivos, como portadores inaparentes con bajos niveles de parasitemia, y, por lo tanto, no presentar cambios significativos en el hemograma.

Esto es confirmado por Rotschild (2007), quien registró que los anticuerpos pueden estar presentes en ausencia del parásito, debido a la eliminación de *B. caballi* por parte del sistema inmune del caballo, sin embargo, esto no ocurre con *T. equi*, por lo que los caballos permanecen infectados de por vida (Rotschild y col 2007, Schein 1981).

Por lo tanto, se hace necesario utilizar un método de diagnóstico que sea capaz de detectar al parásito directamente, como lo es la PCR, ya que de esta forma se podría determinar a los animales que efectivamente se encuentran infectados por *B. Caballi* y *T. equi* y así descartar a los animales que solo presentan anticuerpos debido a una exposición previa.

Finalmente, se rechaza la hipótesis anteriormente planteada, ya que la única alteración significativa del hemograma fue la presencia de mayores concentraciones de proteínas plasmáticas totales de los animales expuestos a la PE, dentro del rango de referencia para la especie, por lo que no tendría significancia clínica en los animales y se trataría de una etapa crónica de la enfermedad o fase de convalecencia.

6.3. CONCLUSIONES

- La frecuencia de seropositividad a *Babesia caballi* fue mayor a la de *Theileria equi* en Caballos Fina Sangre de Carrera del Hipódromo de Chile.
- No se observaron diferencias en el eritrograma, leucograma o recuento de plaquetas ente Caballos Fina Sangre de Carrera seropositivos y seronegativos a *Babesia caballi* y/o *Theileria equi*.
- Caballos Fina Sangre de Carrera seropositivos a *Babesia caballi* y/o *Theileria equi*, presentaron concentraciones superiores para las proteínas plasmáticas totales en el hemograma.

7. REFERENCIAS

- Abdullah D, S Ashraf, V Morin-Adelineb, M Alyousifc, J Slapetab. 2014. Quantitative PCR detection of *Theileria equi* using laboratory workflows to detect asymptomatic persistently infected horses. *Vet Parasitol* 206, 138-145.
- Acici M, S Umur, T Guvenc, HH Arslan, M Kurt. 2008. Seroprevalence of equine babesiosis in the Black Sea region of Turkey. *Parasitol Int* 57, 198-200.
- Asgarali Z, D Coombs, F Mohammed, M Campbell, E Caesar. 2007. A serological study of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Thoroughbreds in Trinidad. *Vet Parasitol* 144, 167– 171.
- Ausset G. 1999. Piroplasmosis equina en criaderos de caballos Fina Sangre de Carrera en la quinta región y región metropolitana. Memoria de Título, Escuela de Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Barrera R, MV Carapeto, MA Habela, C Zaragoza. 2010. Electrophoretic pattern of serum proteins in horses with babesiosis. *Arch Med Vet* 42, 173-178.
- Bartolomé Del Pino L, R Nardini, V Veneziano, F Iacoponi, A Cersini, L Autorino Gian, F Buono, M Scicluna. 2016. *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Central-Southern Italy: Sero-molecular survey and associated risk factors. *Ticks Tick borne Dis* 7, 399-508.
- Bashiruddin JB, C Camma, E Rebelo. 1999. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. *Vet Parasitol* 84, 75-83.
- Campano S. 1991. Distribución de *Babesia caballi* (Apicomplexa: Babesiidae) en equinos Fina Sangre. *Parasitol día* 15, 128 –130.
- Cantu-Martinez MA, JC Segura-Correa, ML Silva-Paez. 2012. Prevalence of antibodies to *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from northeastern Mexico. *J Parasitol* 98, 869–70.
- Cunha C, S Da silva, B Lícia, C Luckemeyer. 1998. Haematological and serological changes in horses experimentally infected with *Babesia equi*. *Ciência Rural* 28, 283-286.
- Cunha C, T McGuire, L Kappmeyer. 2006. Development of specific immunoglobulin G_a (IgG_a) and IgG_b antibodies correlates with control of parasitemia in *Babesia equi* infection. *Clin Vaccine Immunol* 13,297–300.

- De Waal DT. The transovarial transmission of *Babesia caballi* by *Hyalomma truncatum*. 1990. *Onderstepoort J Vet Res* 57, 99–100.
- Divers T. 1998. Liver failure: hemolytic anemia. In: *Manual of equine emergencies* (ed). WB Saunders, Philadelphia, USA, Pp 273-296.
- Ernst N. 1999. Piroplasmosis en caballos Fina Sangre de carrera. Estudio serológico en el Club Hípico de Santiago, Chile. 1999. Memoria de Título, Escuela de Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Friedhoff KT, AM Tenter, I Muller. 1990. Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. *Rev Sci Tech* 9, 1187-94.
- González D, G Valenzuela, L Moreno, K Ardiles, A Guglielmone. 2006. Nuevos hospederos para garrapatas *Amblyomma tigrinum* y *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) en Chile. *Arch Med Vet* 38, 273 – 275.
- Guimaraes A, J Lima, M Ribeiro. 1998. Ultrastructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult female *Boophilus microplus* ticks. *Parasitol Res* 84, 69–74.
- Kappmeyer L, L Perryman, S Hines. 1999. Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* by recombinant *B. caballi* rhoptry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 37, 2285–90.
- Kaps M, W Lamberson. 2004. One-way Analysis of Variance. In: *Biostatistics for Animal Science*. USA. Pp 204-241.
- Kerber C.E, M Labruna, F Ferreira, T De Wall, D Knowles, M Gennari. 2009. Prevalence of equine piroplasmosis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 18, 1–8.
- Kumar S, DV Malhotra, AK Nichani. 2002. Identification of immunoreactive polypeptides of *Babesia equi* parasite during immunization. *Vet Parasitol* 107, 295-301.
- Mahmoud MS, NT El-Ezz, S Abdel-Shafy, SA Nassar, AH El Namaky, W Khalil, D Knowles, L Kappmeyer, M Silva, C Suarez. 2016. Assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in equine populations in Egypt by molecular, serological and haematological approaches. *Parasit Vectors* 9, 260.
- Mehlhorn H, E Schein. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. *Parasitol Res* 84, 467–475.
- Morris D, J Johnston. 2002. Alterations in blood proteins. In: Smith BP. *Large animal internal medicine*. 3rd ed. Mosby, St. Louis, USA. Pp 427-433.

- Mujica F, T Perrone, M Forlano, A Coronado, R Melendez, N Barrios, R Alvarez, F Granda. 2011. Serological prevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses of Lara State, Venezuela. *Vet Parasitol* 178, 180–183.
- Muñoz A, C Riber, P Trigo, F Castejón. 2010. Hematology and clinical pathology data in chronically starved horses. *J Equine Vet Sci* 30, 581–589.
- Nicolaiewsky T, M Richter, V Lunge. 2001. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. *Vet Parasitol* 101, 9–21.
- OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. 2015. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres.
- Pelzel-Mccluskey A, J Traub-dargatz. 2015. Equine Piroplasmosis. En: *Robinson's Current Therapy in Equine Medicine*. 7a ed. USA. Pp 480-483.
- Radostits Q, C Gay, D Blood, K Hinchcliff. 1999. Diseases caused by protozoa. In: *Veterinary medicine*. 9th ed. WB Saunders. London, United Kingdom. Pp 289-1329.
- Rampersad J, E Cesar, M Campbell, M Samlal, D Ammons. 2003. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. *Vet Parasitol* 114, 81-7.
- Ramsay J, M Ueti, W Johnson. 2013. Lymphocytes and macrophages are infected by *Theileria equi*, but T cells and B cells are not required to establish infection in vivo. *Plos One* 8, e76996.
- Rothschild C, D Knowles. 2007. Equine Piroplasmosis. In: *Equine Infection Disease*. 1st ed. Saunders Elsevier. Missouri, USA. Pp 465 - 473.
- Rothschild C. 2013. Equine Piroplasmosis. *J Equine Vet Sci* 33, 497 – 508.
- Rudolph W. 1971. Piroplasmosis en caballos de carrera de Chile. *Chil Parasitol* 26, 66-68.
- Rudolph W, J Correa, L Zurita. 1975. Equine piroplasmosis: leukocytic response to *Babesia equi* (Laveran, 1901) infection in Chile. *Br Vet J* 131, 601–9.
- SAG, Servicio Agrícola y Ganadero. 2014. Informe Sanidad Animal Chile.
- Salim B, M Bakheit, J Kamau, C Sugimoto. 2013. Current status of equine piroplasmosis in the Sudan. *Infect Genet Evol* 16, 191–199.
- Schein E, G Rehbein, W Voigt. 1981. *Babesia equi*: Development in horses and in lymphocyte culture. *Tropenmed Parasitol* 32, 223-7.

- Steinman A, T Zimmerman, E Klement, I Lensky, D Berlin, Y Gottlieb, G Baneth. 2012. Demographic and environmental risk factors for infection by *Theileria equi* in 590 horses in Israel. *Vet Parasitol* 187, 558–562.
- Terroba V. 2009. Evaluación de la situación de piroplasmosis en equinos Fina Sangre de Carrera del Hipódromo Chile diagnosticadas mediante inmunofluorescencia indirecta. Memoria de Título. Universidad Santo Tomás, Santiago, Chile.
- Thrusfield M. 2007. *Veterinary Epidemiology*, 3rd Edition. Wiley-Blackwell, USA.
- Tizard I. 1996. *Veterinary immunology an introduction*. 5th ed. WB Saunders. Philadelphia, USA. Pp 316-321.
- Torres A. 2004. Prevalencia de piroplasmosis en equinos Fina Sangre Inglés de Carrera y mestizos de la V Región. Memoria de Título Universidad de Concepción. Facultad de Medicina Veterinaria. Departamento de Ciencias Clínicas.
- Vargas D, R Bonet, P Oliva, S Campano. 2007. Implementación de la técnica de PCR en la identificación de *Babesia ssp* en equinos. *Parasitol Latinoam* 59, 179 – 182.
- Viera T, R Viera, M Finger, D Nascimento, P Sicupira, L Dutra, I Deconto, I Barros-Filho, P Dornbusch, A Biondo, O Vidotto. 2013. Seroepidemiological survey of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from a rural and from urban areas of Paraná State, southern Brazil. *Ticks Tick borne Dis* 4, 537-541.
- Weiland G. 1986. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Vet Parasitol* 20, 43–8.
- Wise L, A Pelzel, R Mealey, D Knowles. 2014. Equine Piroplasmosis. *Vet Clin Equine* 30, 677 – 693.
- Wittwer F, H Bohmwald. 1983. *Manual de Patología Clínica Veterinaria*. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. Pp 166-
- Youssef SY, S Yasien, W Mousa, S Nasr, E El-Kelesh. 2015. Vector identification and clinical, hematological, biochemical, and parasitological characteristics of camel (*Camelus dromedarius*) theileriosis in Egypt. *Trop Anim Health Prod* 47, 649-656.
- Zobba R, M Ardu, S Niccolini, B Chessa, L Manna, R Cocco, M Pinna. 2008. Clinical and laboratory findings in equine piroplasmosis. *J Eq Vet Sci* 28, 301 – 308.