

Suplementación con posbióticos en caballos con piroplasmosis

Por María Bravo, María José Montero, David Risco, Waldo García-Jiménez, Pilar Gonçalves, Verónica Arenas, Rosario Cerrato, Pedro Fernández-Llario (Ingulados, S.L.), Julio Fernández (Avegali).

INTRODUCCIÓN

La piroplasmosis equina es una parasitosis producida por los protozoos *Theileria equi* y *Babesia caballi* que está transmitida por varias especies de garrapatas de los géneros *Dermacentor* (Figura 1), *Hyalomma* y *Rhipicephalus*. Es una de las enfermedades más comunes en los caballos y puede afectar a todos los équidos, suponiendo importantes pérdidas económicas en el sector puesto que es la principal causa de restricción del transporte de equinos a nivel internacional. Según la Oficina Internacional de Epizootias, esta enfermedad se considera endémica en prácticamente todos los países habitados por caballos, especialmente zonas con climas templados, como el sur y este de Europa, en Asia y en el centro y sur de América.

Los esporozoitos inoculados a través de la picadura de la garrapata infectada por *Babesia caballi* o *Thei-*

leria equi invaden los eritrocitos (glóbulos rojos) y se transforman en trofozoitos, que se transforman y dividen en merozoitos que pueden infectar nuevos eritrocitos y continuar el proceso de división.



Figura 1. Garrapata del género *Dermacentor*. (Fuente: Google imágenes).



En el caso de *Theileria* se ha demostrado que los esporozoitos también pueden infectar los linfocitos (glóbulos blancos), formando esquizontes que liberan merozoitos y que pueden invadir los eritrocitos (Figura 2).

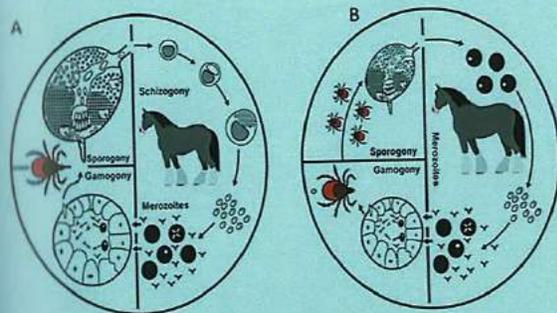


Figura 2. Esquemas del ciclo de vida de *Theileria equi* (A) y *Babesia caballi* (B) en el hospedador vertebrado y el vector invertebrado. (Fuente: Onyiche et al., 2019).

La piroplasmosis equina se puede presentar en las formas hiperaguda, aguda o crónica y los signos clínicos suelen ser inespecíficos, por lo que la enfermedad puede confundirse fácilmente con otros trastornos. Los casos agudos son los más comunes, y se caracterizan por fiebre, en algunos casos intermitente y que suele superar los 40°C, disminución del apetito y pérdida de peso, taquipnea, taquicardia, edemas supraorbital y en las extremidades, congestión de las mucosas y deposiciones fecales más pequeñas y secas de lo normal. Los casos crónicos suelen presentar signos clínicos inespecíficos

como ligera falta de apetito, pérdida de peso y bajo rendimiento en animales de competición. Se ha descrito una forma hiperaguda muy infrecuente en la que los caballos presentan una muerte súbita y suele relacionarse con animales con el sistema inmune debilitado. En las zonas endémicas, muchos caballos se infectan de jóvenes y se mantienen como portadores asintomáticos, actuando como fuentes de infección para las garrapatas, que actúan como vectores de la enfermedad.

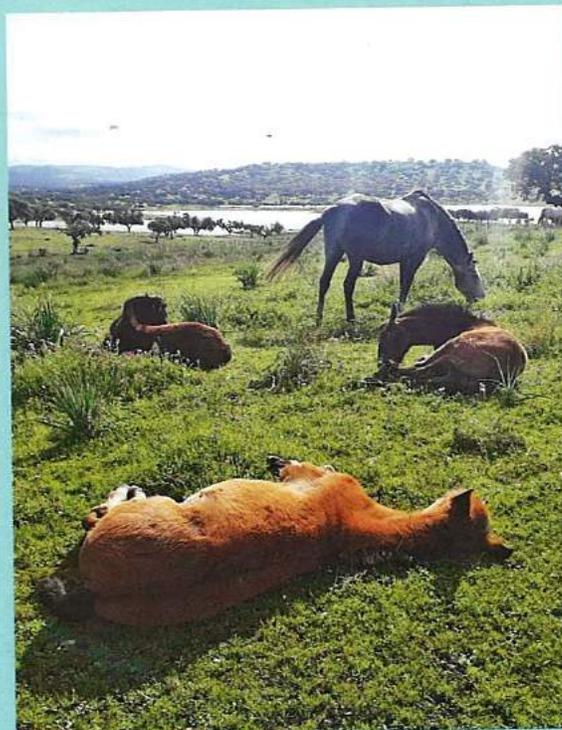
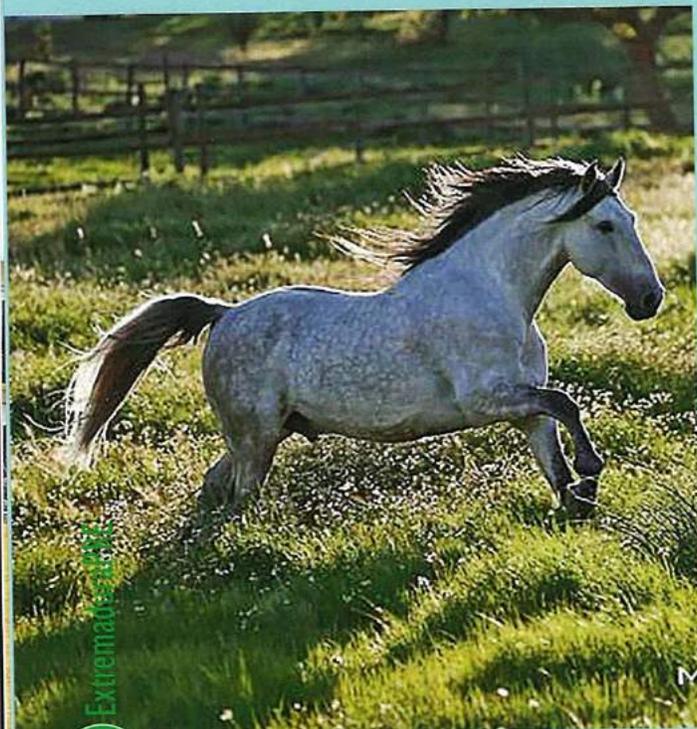
La respuesta inmune de los caballos a la infección por piroplasmosis es compleja y multifactorial. Los animales infectados se mantienen como portadores, en muchos casos asintomáticos, por lo que la interacción entre el parásito y el sistema inmune del hospedador es constante. En algunas ocasiones, los portadores sometidos a un proceso de estrés o a enfermedades o fármacos que cursen con inmunosupresión, pueden multiplicar el parásito



en la sangre y manifestar los signos clínicos en algún momento de su vida. La respuesta inmune innata de los animales es vital, aunque no se conocen con precisión el papel exacto de los macrófagos, neutrófilos y células NK. Asimismo, también se considera de importancia la respuesta inmune adaptativa para una protección completa frente al parásito, especialmente en animales jóvenes.

Por todo ello, se plantea la utilización de suplementos inmunomoduladores, como los posbióticos, para el control de la piroplasmosis equina. Los posbióticos son compuestos bioactivos generados a partir de la fermentación de bacterias beneficiosas, así como componentes de la pared celular liberados tras la lisis bacteriana, que pueden tener un efecto beneficioso para la salud de los hospedadores gracias a sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Los metabolitos posbióticos incluyen enzimas, péptidos, polisacáridos, ácidos grasos y otros componentes que pueden activar determinadas rutas inmunológicas que son importantes para el control de determinadas infecciones en los animales.

INGUBAL EQUINE® es un suplemento oral elaborado a partir de la fermentación de bacterias ácido lácticas con actividad probiótica demostrada, que modula la microbiota intestinal y la respuesta inmune de los hospedadores (Figura 3).



Su eficacia ha sido ampliamente demostrada en varias especies animales y, a continuación, se presentan los resultados de un estudio preliminar realizado en caballos.

El objetivo de la experiencia fue valorar la evolución de la piroplasmosis en caballos tras la suplementación con INGUBAL EQUINE® durante un periodo de 4 meses.



Figura 3. Ingubal equine®.

MÉTODO

Se realizó la experiencia incluyendo 10 caballos pertenecientes a una finca situada en la provincia de Cáceres. Los caballos tenían edades comprendidas entre los 2 y los 8 años y se dividieron en dos grupos.

- El grupo control recibió su alimentación estándar (avena molida) sin suplementar, con las mismas pautas que reciben habitualmente.
- El grupo suplementado siguió la misma pauta de alimentación, pero suplementado con INGUBAL EQUINE® a ración de 12,5g por día durante 120 días.

Los animales fueron muestreados antes y después de la suplementación (Figura 4). La primera toma de muestras se considera para realizar el diagnóstico inicial y la planificación de la experiencia, mientras que la segunda se utiliza para monitorizar la evolución de determinados parámetros que se describirán a continuación.



Figura 4. Recogida de muestras. Fuente propia.

Se tomaron muestras de sangre entera y suero en tubos con y sin anticoagulante. Mediante la muestra de suero se realizó un perfil bioquímico completo y las muestras con anticoagulante han sido empleadas para realizar hemogramas. La determinación de parásitos hemáticos se realizó mediante microscopía en frotis sanguíneo (Figura 5). Para la confirmación del diagnóstico de parásitos

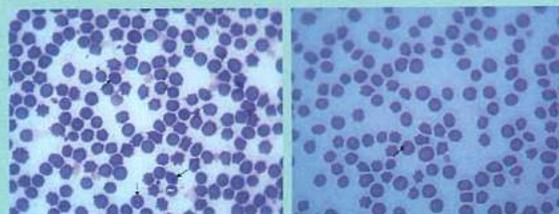


Figura 5. Microscopía compatible con piroplasmosis. Alta carga parasitaria (izquierda) y baja carga parasitaria (derecha). Fuente propia.

hemáticos se realizó la extracción del ADN y la detección mediante PCR genérica de especies de los géneros *Babesia spp.* y *Theileria spp.* y la identificación de la especie causante de piroplasmosis se llevó a cabo mediante PCR específica y secuenciación. Por último, la detección de la respuesta inmunitaria se realizó mediante enzimoinmunoanálisis de competición (C-ELISA). Además, se realizaron chequeos diarios de todos los animales con el objetivo de identificar posibles signos clínicos de enfermedad.

Los resultados obtenidos en los datos de piroplasmosis y los parámetros sanitarios fueron comparados entre los dos grupos. Para ello utilizamos pruebas estadísticas no paramétricas para comparación de medianas (U-Mann Whitney) y frecuencias (Fisher test).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros sanitarios

Los animales analizados no presentaron signos clínicos en ningún momento del estudio. Para valorar los parámetros sanitarios se tuvieron en cuenta los datos relativos a los hemogramas y las bioquímicas (Tablas 1, 2, 3 y 4). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, ni antes ni después de la suplementación. A excepción de los valores de Hemoglobina Corpuscular Media (HCM), Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (MCHC), que fueron superiores en el grupo suplementado antes y después de la suplementación. En el caso del perfil bioquímico, la albúmina era significativamente superior en el grupo suplementado antes de la suplementación.

Estos resultados sugieren que el suplemento administrado es seguro, puesto que no observamos alteraciones en las analíticas realizadas, ni se han presentado signos clínicos de enfermedad.

Evolución de la piroplasmosis

Los resultados obtenidos del estudio de la piroplasmosis se encuentran recogidos en la Tabla 5. Al inicio de la experiencia (muestra pre-suplementación) el

	SERIE ROJA											
	RBC Pre	RBC Post	HGB Pre	HGB Post	HTC Pre	HTC Post	VCM Pre	VCM Post	HCM Pre	HCM Post	HCMC Pre	HCMC Post
Grupo Ingubal®	9,242	8,908	15	14,26	42,04	40,14	45,48	45,02	16,26	16,02	35,7	35,5
Grupo Control	10,31	9,16	14,52	13,06	42,02	37,62	40,96	41,06	14,18	14,24	34,56	34,68
Valores referencia	6,8-12,9 .10 ³ /μl		12-17 g/dL		32%-50%		42-58 fl		15-20 pg		31-38,6 g/dL	

Tabla 1. Resultados de la hematología (serie roja).

	SERIE BLANCA										PLAQUETAS	
	WBC Pre	WBC Post	LINFO Pre	LINFO Post	MONO Pre	MONO Post	EOSI Pre	EOSI Post	NEUTRO Pre	NEUTRO Post	PLA Pre	PLA Post
Grupo Ingubal®	9,242	8,908	15	14,26	42,04	40,14	45,48	45,02	16,26	16,02	130,4	153,6
Grupo Control	10,31	9,16	14,52	13,06	42,02	37,62	40,96	41,06	14,18	14,24	151,2	177,6
Valores referencia	5,4-14,3 .10 ³ /μl		17%-68%		0%-14%		0%-10%		22%-72%		100-600 .10 ³ /μl	

Tabla 2. Resultados de la hematología (serie blanca y plaquetas).

	PROTEINAS				HEPÁTICO								RENAL			
	ALB Pre	ALB Post	PROT Pre	PROT Post	ALP Pre	ALP Post	ALT Pre	ALT Post	GGT Pre	GGT Post	BIL Pre	BIL Post	CREAT Pre	CREAT Post	URE Pre	URE Post
Grupo Ingubal®	3,68	2,4	6,952	6,4	155,2	179,6	16,4	8,8	17	15,25	1,38	1,26	1,416	1,326	25,4	19,2
Grupo Control	3,36	2,4	7,408	7	388,4	333,6	10,4	11	15	17,8	1,48	1,46	1,53	1,464	31	30,6
Valores referencia	1,7-3,9 g/dL		4,7-8,9 g/dL		138-251 IU/L		3-23 IU/L		4-44 IU/L		1-2 mg/dL		0,9-1,9 mg/dL		3,57-8,57 mmol/L	

Tabla 3. Resultados de los perfiles bioquímicos proteico, hepático y renal

	GENERAL				NUTRICIONAL							
	LDH Pre	LDH Post	CK Pre	CK Post	GLU Pre	GLU Post	CA Pre	CA Post	COL Pre	COL Post	TRIG Pre	TRIG Post
Grupo Ingubal®	989	1385,2	395,8	-	56,4	33,4	12,096	10,814	119,6	100,6	28,4	24,4
Grupo Control	1238,8	1720,4	421,8	-	36,4	3,4	11,706	10,758	105,4	90,4	26	15,6
Valores referencia	162-412 IU/L		2,4-23,4 IU/L		75-115 IU/L		11,2-13,6 mg/dL		75-150 mg/dL		11-68 mg/dL	

Tabla 4. Resultados de los perfiles bioquímicos general y nutricional.

	Parásitos sanguíneos (PCR)- Pre	Parásitos sanguíneos (PCR)- Pos	Anticuerpos frente a <i>T. equi</i> - Pre	Anticuerpos frente a <i>T. equi</i> - Pos
	Grupo Ingubal®	60 %	0 %	80 %
Grupo Control	60 %	60 %	60 %	80 %

Tabla 5. Evolución de la piroplasmosis.



porcentaje de animales positivos a parásitos hemáticos era el mismo en ambos grupos (60%). Tras la suplementación con INGUBAL EQUINE® la reducción del parásito ha sido del 100% en el grupo suplementado, manteniéndose estable en el grupo control que no recibió suplementación. El parásito que más se encuentra presente en esta población es *Theileria equi*.

Estos resultados de la evolución de la piroplasmosis indican que la suplementación con INGUBAL EQUINE® podría ayudar al control de la infección por estos parásitos sanguíneos, puesto que se ha conseguido eliminar el parásito de la circulación periférica en todos los animales tratados. Este hecho es muy importante de cara al control de la enfermedad en zonas endémicas, en las que existe un alto porcentaje de animales portadores asintomáticos que pueden actuar como reservorios del parásito y fuentes de infección para garrapatas.

En cuanto a la detección de la respuesta inmune, todos los animales que fueron positivos mediante C-ELISA continuaron siendo positivos hasta el final de la experiencia, por lo que sería recomendable continuar con la administración del suplemento y monitorizar a los animales hasta comprobar la desaparición de anticuerpos sanguíneos.

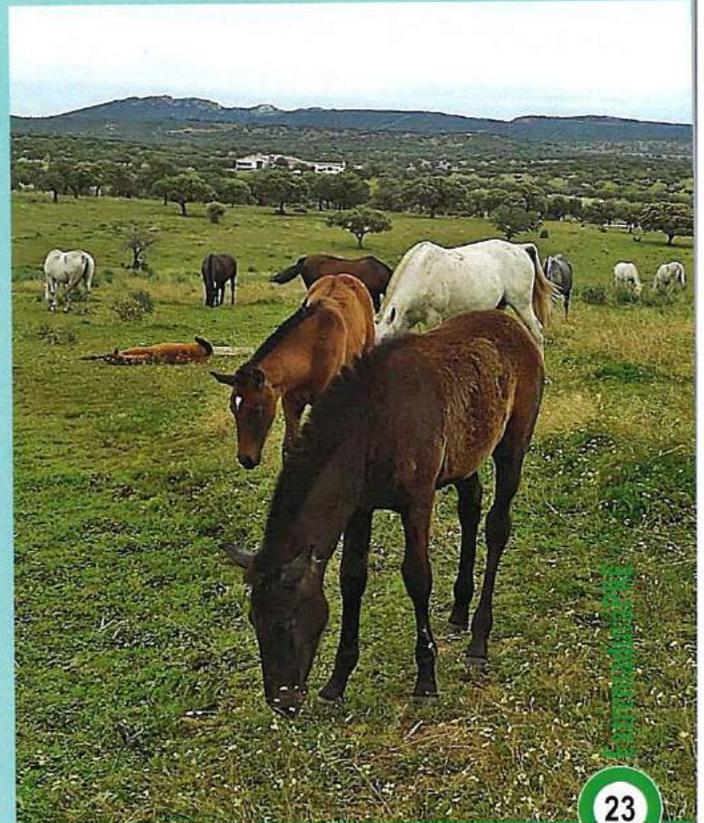
Estos resultados son comparables a otros estudios realizados en poblaciones con animales positivos a piroplasmosis, en los que se consigue eliminar el parásito en sangre periférica mediante la administración de dipropionato de imidocarb, pero no los anticuerpos, que pueden persistir hasta 12 meses después de la infección.

Efectos de la suplementación sobre el sistema inmune

La suplementación con elementos moduladores de la microbiota intestinal y del sistema inmune, como es el caso de INGUBAL EQUINE®, ha demostrado ser útil para desarrollar una respuesta inmune de forma rápida y eficaz en los animales en los que son administrados.

Los efectos de las bacterias ácido lácticas y sus metabolitos sobre la inmunidad innata se relacionan con la maduración de las células de la estirpe mielóide con capacidad fagocítica, como las células dendríticas y los macrófagos, además de favorecer la actividad citotóxica de las células NK. Todas estas células son fundamentales para la defensa de los animales, puesto que modulan la respuesta inmune, realizando procesos de fagocitosis y destrucción de las células infectadas.

Los efectos de la suplementación sobre la respuesta inmune adquirida son variados, pudiendo afectar a las poblaciones linfocitarias y a la expresión de genes relacionados con la producción de citoquinas proinflamatorias, antiinflamatorias o reguladoras. También se ha propuesto una estimulación de la respuesta inmune humoral, induciendo la diferenciación de linfocitos B maduros encargados de la producción de anticuerpos específicos.



Todos estos mecanismos relacionados con la inducción de una respuesta inmune efectiva en los caballos serán investigados en mayor profundidad en futuros estudios. No obstante, los resultados de este estudio preliminar son muy interesantes y nos instan a desarrollar futuras investigaciones en este ámbito.

CONCLUSIONES

La suplementación con el posbiótico INGUBAL EQUINE® consigue eliminar la piroplasmosis de la sangre periférica posiblemente por el desarrollo de mecanismos inmunomoduladores en los caballos, que serán descritos en profundidad en futuros estudios. Gracias a la suplementación, se consigue reducir el número de animales portadores con infección persistente, que en la mayoría de los casos son asintomáticos, y que son reservorios de la infección para las garrapatas, asegurando su diseminación a otros animales. Para conseguir reducir los anticuerpos en sangre, se debe monitorizar durante un periodo más largo de tiempo a los caballos positivos.

Este trabajo fue presentado en el XX Congreso Internacional de Medicina y Cirugía Equina (SICAB), celebrado en Sevilla en noviembre de 2019 y obtuvo el reconocimiento al Mejor Póster Experimental. ■

REFERENCIAS

- BRavo, M., MARTÍNEZ, C., RISCO, D., GARCÍA-JIMÉNEZ, W., GONÇALVES, P., MONTERO, M. J. ... & PÉREZ, J. R. (2019). Efecto inmunomodulador de las bacterias ácido lácticas. *Ganadería*, (122), 52-54.
- DOBSON, A., COTTER, P. D., ROSS, R. P., & HILL, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl. Environ. Microbiol.*, 78 (1), 1-6.
- OIE. (2018) Piroplasmosis equina. Manual terrestre de la OIE 2018. Consultado en: https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.05.08_Piroplasmosis_equina.pdf
- ONYICHE, T. E., SUGANUMA, K., IGARASHI, I., YOKOYAMA, N., XUAN, X., & THEKISOE, O. (2019). A review on equine piroplasmosis: epidemiology, vector ecology, risk factors, host immunity, diagnosis and control. *International journal of environmental research and public health*, 16 (10), 1736.
- PAGNINI, C., SAEED, R., BAMIAS, G., ARSENEAU, K. O., PIZARRO, T. T., & COMINELLI, F. (2010). Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proceedings of the national academy of sciences*, 107 (1), 454-459.
- ROTHSCHILD, C. M. (2013). Equine piroplasmosis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33 (7), 497-508.
- UETI, M. W., MEALEY, R. H., KAPPMAYER, L. S., WHITE, S. N., KUMPULA-MCWHIRTER, N., PELZEL, A. M., ... & HENDRICKSON, A. (2012). Re-emergence of the apicomplexan *Theileria equi* in the United States: elimination of persistent infection and transmission risk. *PloS one*, 7 (9).

