



SCHOOL OF
VETERINARY MEDICINE

UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona



ASSAIG SEROMOLECULAR I FACTORS DE RISC ASSOCIATS DE LA PIROPLASMOSI EQUINA EN CAVALLS DE PURA RAÇA MENORQUINA

Dr. Sergi Olvera Maneu

Dra. Fátima Cruz López

Dr. Manel López Béjar

Dr. Eduard Jose Cunilleras

2025

Finançat per:

Institut Menorquí d'Estudis; Ajuts a la investigació de l'IME 2023 - Exp. I0015/2023/00004.



Amb la col·laboració de:



La piroplasmosi equina és una malaltia infecciosa causada pels protozous intracel·lulars *Babesia caballi* i *Theileria equi*, i transmesa per paparres de diversos gèneres. Aquesta malaltia representa una de les principals restriccions per al moviment internacional d'èquids. L'objectiu principal d'aquest estudi va ser estimar la seroprevalença i la prevalença de la piroplasmosi equina en cavalls de Pura Raça Menorquina (PRMe) residents a Menorca, així com identificar-ne els possibles factors de risc associats. A l'estudi es van incloure un total de 215 exemplars de PRMe, 124 mascles (87 adults i 37 poltres) i 91 femelles (64 adultes i 27 pollines). De cada animal es van obtenir aproximadament 10 mL de sang mitjançant punció jugular. Posteriorment les mostres van ser processades seguint els protocols establerts. Durant el mostreig es va realitzar un qüestionari amb preguntes sobre el maneig, el tipus d'explotació i les característiques individuals de cada animal per posteriorment identificar els possibles factors de risc. Les mostres de sèrum es van analitzar per determinar els títols d'anticossos específics contra els paràsits mitjançant la tècnica d'ELISA de competició. A més, es va realitzar una PCR quantitativa en temps real de totes les mostres per detectar els gens específics 18S rRNA de *Theileria equi* i *Babesia caballi*. Els resultats van mostrar una seroprevalença general per *Theileria equi* del 56,3%, mentre que per *Babesia caballi* va ser, només, del 3,3%. Es van identificar diverses variables com a possibles factors de risc associats a la seroprevalença de *Theileria equi*, entre elles el municipi d'origen, l'edat de l'animal, una major extensió de l'explotació i el contacte amb fauna salvatge. Per contra, una desparasitació externa freqüent es va associar amb una reducció significativa de la seroprevalença. Pel que fa a la prevalença, *Theileria equi* va presentar una taxa de positivitat del 19,5%, mentre que per *Babesia caballi* va ser del 0%. De manera similar, el municipi d'origen, l'edat de l'animal i el contacte amb altres animals, tant domèstics com salvatges, es van identificar com a factors de risc rellevants. La presència elevada de *Theileria equi* a Menorca i els potencials factors de risc identificats suggereixen la necessitat d'implementar estratègies preventives dirigides al control dels vectors i al tipus de maneig per reduir la propagació del paràsit en la població equina de l'Illa.

1. INTRODUCCIÓ

La piroplasmosi equina és una malaltia infecciosa causada pels protozous intracel·lulars *Babesia caballi* i *Theileria equi* i transmesa per paparres del gènere *Dermacentor*, *Rhipicephalus* i *Hyalomma*. Aquesta malaltia afecta cavalls, rucs, mules i altres espècies d'èquids provocant manifestacions clíniques associades com poden ser febre, icterícia, anèmia, hemoglobinúria, bilirubinúria i, ocasionalment, la mort. Una vegada els cavalls han superat la infecció, aquests poden romandre com a portadors asimptomàtics durant llargs períodes de temps (*Babesia caballi*) o fins i tot per a tota la vida (*Theileria equi*), convertint, així, la malaltia en endèmica [1,2]. Un resum comparatiu entre els dos agents causals es troba a la **Taula 1**.

Taula 1. Taula comparativa dels principals trets diferencials entre *Babesia caballi* i *Theileria equi*, els dos agents causals de la piroplasmosi equina. S'hi destaquen les vies de transmissió, la clínica i la persistència, aspectes clau per al diagnòstic i maneig de la malaltia.

	<i>Babesia caballi</i>	<i>Theileria equi</i>
Agent etiològic	<i>Babesia caballi</i>	<i>Theileria equi</i>
Transmissió	Paparres, iatrogènica, transplacentària (<i>molt poc comuna</i>)	Paparres, iatrogènica, transplacentària (<i>poc comuna</i>)
Clínica	Quadres moderats	Quadres greus, amb risc de mort sobtada
Persistència	No persistent si es tracta adequadament	Persistent malgrat el tractament; Estat de portador asimptomàtic
Immunitat posterior	Temporal	Llarga durada

Els fets exposats anteriorment provoquen que la piroplasmosi equina sigui una de les principals restriccions per al moviment internacional d'èquids des de països endèmics, com és el cas d'Espanya, a països lliures, fet que es tradueix en greus pèrdues econòmiques per al sector equí, en totes les seves vessants [3–5]. Tal com s'estableix al capítol 12, article 12.7.2, del Codi Sanitari pels Animals Terrestres de l'Organització Mundial de Sanitat Animal (OMSA; antiga OIE), les autoritats veterinàries dels països importadors hauran d'exigir la presentació d'un certificat veterinari internacional que acrediti que els animals: (1) no manifesten cap signe clínic de piroplasmosi equina el dia del moviment; (2) han donat un resultat negatiu en proves de diagnòstic de piroplasmosi equina efectuades menys de 30 dies abans del moviment; i (3) s'han mantingut exempts de paparres, mitjançant un tractament preventiu en els casos necessaris, també, els 30 dies anteriors al moviment. Per la detecció de piroplasmosi equina existeixen diversos mètodes, tant directes com indirectes, i l'immunoassaig enzimàtic de competició és la prova d'elecció recomanada per al diagnòstic proposada per l'Organització Mundial de Sanitat Animal (OMSA). Aquesta prova serològica distingeix entre *Theileria equi* i *Babesia caballi* i s'ha demostrat que té una major especificitat que altres proves diagnòstiques [1,2,6,7].

La piroplasmosi equina és endèmica en moltes regions d'Àsia, Amèrica, Àfrica i Europa. A Europa, concretament, la malaltia s'ha reportat en cavalls del Regne Unit, França, Alemanya, Suïssa, Itàlia, Grècia, República Txeca, Hongria, Polònia o Portugal, així com també a Espanya [1,2,7–12]. Un nombre limitat d'estudis han analitzat la prevalença d'aquesta malaltia en cavalls d'arreu de l'estat Espanyol, mostrant uns resultats

variables depenent de la regió i els anys avaluats [3–5,8,9,13,14]. No obstant aquest fet, a l'estudi publicat per Camino et al. [3], es conclou que gairebé la meitat dels cavalls que resideixen a Espanya tenen anticossos contra la piroplasmosi equina o parasitemia circulant. Tot i la seva rellevància, la informació sobre aquesta malaltia a les Illes Balears és molt limitada, i, en el cas concret de Menorca, el coneixement epidemiològic específic és pràcticament inexistent. A l'estudi publicat per Camino et al. [5], de les 740 mostres analitzades, només 9 corresponien a les Illes Balears, reportant una seroprevalença per *Theileria equi* i *Babesia caballi* del 0%, possiblement deguda al poc nombre de mostres disponibles per aquesta zona en comparació a la resta de comunitats autònomes estudiades. No obstant aquest fet, entre els anys 2021-2022 al *Servicio de Vigilancia Sanitaria Equina del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria* (SEVISEQ-VISAVET) de la *Universidad Complutense de Madrid*, es van analitzar mostres de 17 cavalls de Pura Raça Menorquina. Els resultats de les anàlisis van determinar que el 41.1% dels animals analitzats havien estat en contacte amb un dels agents causants de la malaltia (dades no publicades).

El cavall de Pura Raça Menorquina (PRMe) juga un paper fonamental en la cultura i identitat de la societat menorquina, sent un dels principals protagonistes en les seves festes patronals [15]. Des de l'any 1988 la raça és promoguda per l'Associació de Criadors i Propietaris de Cavalls de Raça Menorquina, creada per difondre i mantenir les característiques del cavall menorquí i també reconeguda per la *Jefatura de Cria Caballar* del Ministeri de Defensa espanyol. Actualment, el PRMe està classificat pel Ministeri d'Agricultura, Pesca i Alimentació del Govern d'Espanya com una raça autòctona amenaçada i el cens actual és d'aproximadament uns 4000 individus. La majoria de cavalls de raça menorquina es troben localitzats principalment a l'illa de Menorca tot i que des de fa més de deu anys la raça ha començat la seva expansió pel territori peninsular i diferents països d'Europa i Amèrica. En els últims anys, la creixent exportació d'animals de raça menorquina a tercers països, ha despertat un notable interès entre ramaders, criadors i propietaris de l'illa sobre la presència d'aquesta malaltia, de control epidemiològic limitat, i que és coneguda popularment a Menorca com el “mal groc”.

Obtenir un coneixement acurat de l'estat d'aquesta malaltia en la població de PRMe a Menorca és de gran importància per ramaders, criadors i propietaris. Aquest coneixement permetrà prendre decisions fonamentades en la protecció i millora de la Raça. Mitjançant la comprensió de l'estat epidemiològic d'aquesta malaltia, serà possible establir programes de control i vigilància efectius que contribueixin a minimitzar la propagació de la mateixa. Per altra banda, la restricció en els moviments i el comerç d'animals afectats pot tenir un impacte significatiu en la indústria equina, limitant les oportunitats de venda i reproducció de cavalls de pura raça i generant pèrdues econòmiques substancials. En resum, la importància de conèixer l'estat epidemiològic de la piroplasmosi equina en aquesta població radica en la conservació de la Raça, o dit d'altra manera, aquest coneixement contribuirà en la seva viabilitat a llarg termini, reforçant la seva continuïtat com a part integral del llegat cultural, social i històric de l'illa de Menorca.

L'objectiu principal del projecte és estimar la seroprevalença i la prevalença de piroplasmosi equina en cavalls PRMe residents a Menorca així com determinar-ne els potencials factors de risc associats.

2. MATERIALS I MÈTODES

a. POBLACIÓ ESTUDIADA I DISTRIBUCIÓ GEOGRÀFICA

Un total de 215 exemplars de PRMe van ser mostrejats durant els dies 1, 2 i 3 de juliol de 2024 a Menorca. Del total dels animals 87 eren mascles, 64 femelles, i 64 poltres (37 mascles (pollins), 27 femelles (pollines)). Es van considerar com a poltres els animals amb una edat inferior o igual a tres anys. Les mostres es van recollir considerant el nombre total d'animals residents i censats a cada un dels municipis de l'illa i amb un màxim de 12 individus per Registre d'Explotació Ramadera (REGA) (**Taula 2**). Tot i que la idoneïtat de la selecció dels participants hauria d'haver sigut completament aleatòria, a causa de les característiques de la població a estudiar, es va fer una crida pública per tal d'inscriure els participants de manera voluntària respectant al màxim la distribució i densitat geogràfica. Sant Lluís va ser l'únic municipi sense cap participant. La gestió, organització i inscripció dels individus va ser realitzada per l'Associació de Criadors i Propietaris de Cavalls de Raça Menorquina.

Taula 2. Distribució del nombre total de mascles, femelles, pollins i pollines de Pura Raça Menorquina mostrejats als diferents municipis de Menorca. Es presenten els valors absoluts i el percentatge respecte al total d'individus de cada categoria. Els percentatges en la darrera fila representen la proporció de cada municipi sobre el total dels 215 individus mostrejats.

Sexe	ALAIOR	CIUTADELLA	ES CASTELL	FERRERIES	MAÓ	ES MERCADAL	ES MIGJORN	GRAN	TOTAL
Masclle	11	20	9	17	14	2	14		87 (40,47%)
Femella	1	37	5	6	3	4	8		64 (29,77%)
Polli	0	14	2	10	1	4	6		37 (17,21%)
Pollina	0	14	2	7	1	3	0		27 (12,56%)
TOTAL	12 (5,58%)	85 (39,53%)	18 (8,37%)	40 (18,60%)	19 (8,84%)	13 (6,05%)	28 (13,02%)		215

b. ÈTICA, MOSTREIG, I QÜESTIONARI D'IDENTIFICACIÓ DE POTENCIALS FACTORS DE RISC

El present estudi es va realitzar d'acord amb la Directiva Europea 2010/63/UE. Tots els animals van ser mostrejats una sola vegada amb finalitats diagnòstiques, sense procediments experimentals addicionals. A més també es va obtenir el consentiment informat dels propietaris de tots els participants abans de l'inici de l'estudi.

La recollida de mostres de sang es va realitzar mitjançant la punció de la vena jugular. Per garantir la seguretat i el benestar dels animals, aquests van ser adequadament immobilitzats i manipulats per personal experimentat així com també pels seus propietaris, seguint protocols estandarditzats per a aquest procediment. Abans de la punció, la zona del coll corresponent es va netejar i desinfectar amb solució antisèptica per minimitzar el risc potencial d'infeccions. Es van utilitzar agulles estèrils de calibre 18-20 G, adequades per al

volum requerit i per reduir possibles molèsties als animals. De cada animal es van obtenir aproximadament 10 mL de sang, que es van recollir en tubs estèrils amb anticoagulant (EDTA) i sense. Els tubs amb EDTA es van destinar a l'extracció d'ADN per a la posterior realització de PCR. Els tubs sense anticoagulant es van deixar coagular a temperatura ambient per obtenir sèrum per a les anàlisis serològiques. Les mostres van ser etiquetades i transportades en condicions de refrigeració (4 °C) en neveres isotèrmiques per mantenir la seva integritat. Un cop al laboratori, es van processar en un termini màxim de 24 hores posteriors a la recollida. Per a les mostres de sèrum, es va realitzar una centrifugació a 3.000 rpm durant 10 minuts, i el sobrenedant es va al·litzar en microtubs d'1,5 mL per al seu posterior emmagatzematge i transport a -20 °C fins al moment de l'anàlisi. Les mostres amb EDTA van ser igualment al·litzades en microtubs estèrils d'1,5 mL.

La recopilació d'informació relacionada amb els cavalls participants en l'estudi es va realitzar mitjançant un formulari estandarditzat i prèviament validat per SEVISEQ-VISAVET. Aquest formulari, incloïa dades rellevants sobre cada animal com ara: identificació individual (nom i microxip), edat, sexe, estat fisiològic, historial clínic recent, vacunacions, desparasitació, hàbitat (estabulació o pastura), possibles signes clínics associats a la malaltia d'interès, mobilitat i altres dades relacionades amb l'explotació. Una versió detallada del formulari corresponent es pot consultar a Camino et al. [5]. Els formularis es van omplir durant els mostrejos *in situ* amb els propietaris o cuidadors dels animals. Tots els formularis es van digitalitzar i van ser emmagatzemats en una base de dades segura, accessible només per al personal autoritzat. Les dades recollides s'han utilitzat exclusivament per a finalitats científiques en el marc d'aquest estudi i s'han tractat d'acord amb la normativa vigent sobre protecció de dades personals.

c. DIAGNÒSTIC

i. SEROLOGIA – ELISA DE COMPETICIÓ

Les mostres de sèrum es van analitzar per determinar els títols d'anticossos específics, majoritàriament IgG, contra els paràsits *Theileria equi* i *Babesia caballi* utilitzant kits comercials específics per a cada paràsit. Més concretament, els tests es basen en un assaig immunoenzimàtic de competició (cELISA). Les anàlisis es van dur a terme seguint les instruccions del fabricant [*Theileria equi* i *Babesia caballi* Antibody Test Kits (VMRD Inc., Pullman, Washington, EUA)]. Segons el fabricant, aquests tests presenten una sensibilitat del 95,0% per a *Theileria equi* i del 100% per a *Babesia caballi*, així com una especificitat del 99,5% i del 100%, respectivament. Els resultats es van calcular a partir de la densitat òptica mesurada a 620 nm i els valors obtinguts es van classificar segons l'índex de positivitat (IP) com a positius ($IP \geq 40\%$), o negatius ($IP < 40\%$).

ii. PCR

L'ADN genòmic total es va extreure a partir de 200 µL de sang amb EDTA utilitzant el kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN, Germantown, Maryland, EUA), seguint les instruccions i recomanacions del fabricant.

L'ADN extret es va conservar a -40°C . L'anàlisi de l'ADN de les mostres de sang es va analitzar mitjançant *multiplex quantitative real-time PCR*, emprant primers i sondes TaqMan per detectar de manera simultània i específica el gen 18S rRNA de *Theileria equi* i *Babesia caballi*. Es van seguir les condicions descrites per Camino et al. [3,5]. Breument, per quantificar la concentració d'ADN de *Theileria equi* i *Babesia caballi*, es va utilitzar una corba estàndard elaborada amb almenys tres dilucions d'un plasmidi que contenia l'ADN objectiu de les dues espècies i a concentracions conegudes. i es van manipular evitant cicles repetits de congelació i descongelació per preservar-ne l'estabilitat. Per garantir la fiabilitat dels resultats es va incorporar un control intern al *PCR mastermix* [Quantifast Pathogen +IC (Qiagen)] per identificar possibles inhibicions en les reaccions. També es va utilitzar aigua lliure d'ARNasa com a control negatiu, juntament amb un control negatiu d'extracció per assegurar-se que no hi hagués contaminació ni en l'etapa d'extracció d'ADN ni en la PCR. Els resultats de la PCR obtinguts a partir de l'ADN extret de les mostres de sang es van expressar en còpies de *Theileria equi* o *Babesia caballi* per μL d'ADN extret.

d. ANÀLISI DE DADES

L'anàlisi de les dades es va realitzar amb el programari R (Versió 4.3.0, R Development Core Team), mentre que les representacions gràfiques es van generar amb QGIS (Versió 3.40.3, QGIS Development Team, Open Source Geospatial Foundation). Inicialment, es van calcular les seroprevalències i les prevalències generals per a ambdós agents causals, definides com la proporció d'individus positius respecte al total de la població avaluada. Posteriorment, també es van calcular les seroprevalències i les prevalències estratificades segons les diferents variables independents. Per identificar possibles factors de risc, es va realitzar una anàlisi univariat. En el cas de les variables categòriques, es va utilitzar la prova del Khi-quadrat, o la prova exacta de Fisher quan les freqüències esperades eren inferiors a cinc. Per a les variables quantitatives, es va emprar la prova t de Student o la U de Mann-Whitney, segons la distribució de les dades avaluada mitjançant la prova de Shapiro-Wilk. Les variables amb un valor de $p < 0,25$ es van considerar candidates per a la inclusió en l'anàlisi multivariant. Aquestes variables es van introduir en un model de regressió logística multivariant amb selecció automatitzada mitjançant el mètode *stepwise*, utilitzant el criteri d'informació d'Akaike (AIC) per determinar el model més parsimoniós. Atès el disseny de l'estudi, es va considerar l'explotació ramadera com a factor d'agrupació per controlar la variabilitat intra-grup, mitjançant l'aplicació d'errors estàndards robustos. A partir del model final, es van estimar les oportunitats relatives (*Odds ratio*) (OR) amb els seus respectius intervals de confiança del 95% i el nivell de significació estadística ($p < 0,05$) per a cadascuna de les variables incloses en el model seleccionat.

3. RESULTATS

a. SEROPREVALENÇA

La seroprevalença general a *Theileria equi* va ser del 56,3% (121/215), mentre que per *Babesia caballi* va ser només del 3,3% (7/215).

Pel que fa a la distribució per municipis, la seroprevalença de *Theileria equi* va mostrar variacions entre els diferents municipis de l'Illa. Ciutadella va presentar la seroprevalença més elevada (68,2%, 58/85), seguida d'Es Migjorn Gran (67,9%, 19/28) i Alaior (58,3%, 7/12). En canvi, els municipis amb menor seroprevalença van ser Ferreries (37,5%, 15/40), Es Castell (38,9%, 7/18) i Maó (42,1%, 8/19). Es Mercadal va mostrar una prevalença intermèdia del 53,8% (7/13) tal com es pot veure en la **Figura 1**.

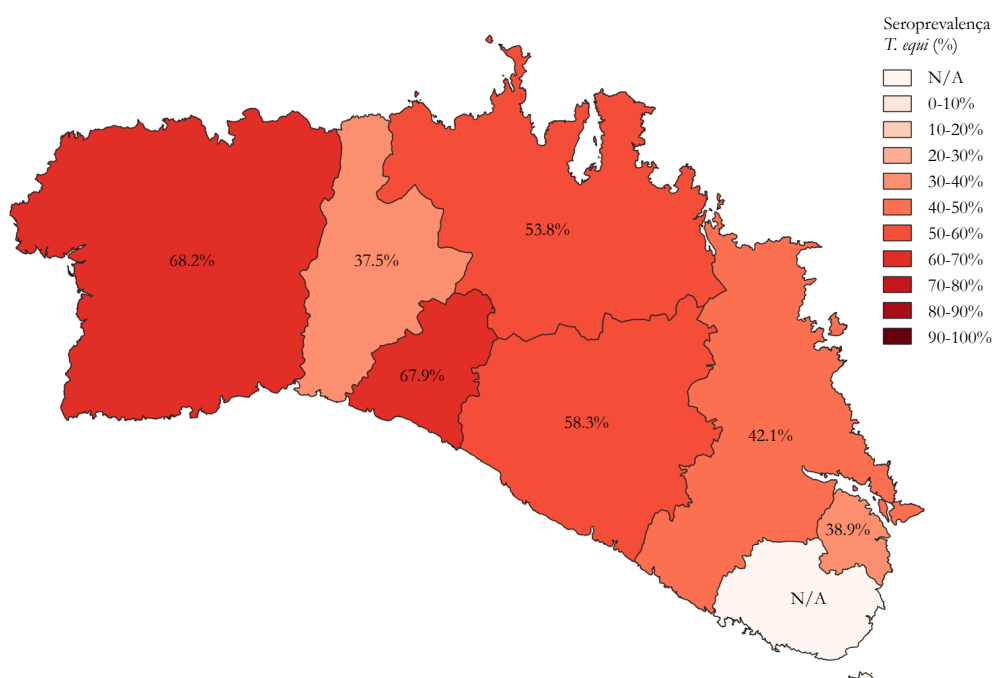


Figura 1. Mapa de Menorca que mostra la seroprevalença a *Theileria equi* en els diferents municipis de l'illa. Els colors representen diferents nivells de seroprevalença, amb tonalitats més intenses indicant valors de seroprevalença més alts.

Respecte a les característiques intrínseques de l'individu com el sexe o l'edat, les femelles van presentar una seroprevalença més elevada (70,3%, 64/91) en comparació amb els mascles (46,0%, 57/124). Respecte a l'edat, els animals adults van mostrar valors del 64,2 % (97/151), mentre que en els poltres la seropositivitat va ser del 37,5% (24/64).

En relació amb les condicions sanitàries, i supervisió dels animals, es va observar que els animals els quals se'ls realitzava una inspecció diària la seroprevalença era inferior (49,4 %, 43/87) en comparació amb aquells sense la realització d'aquesta pràctica (60,9 %, 78/128). D'igual manera, els animals amb una pauta de

desparasitació externa igual o superior a 5 cops per any, la seropositivitat va ser del 35,7 % (5/14), menor en comparació a la resta de pautes. Per acabar, els animals vacunats van mostrar una prevalença del 52,9 % (81/153), mentre que aquells no vacunats van tenir una seroprevalença superior del 64,5 % (40/62).

Finalment i relacionat amb les condicions de maneig i les característiques de l'explotació, els animals en condicions de maneig lliures van presentar la prevalença més alta (60,2%, 68/113), seguits pels animals amb unes condicions d'allotjament mixtes (54,0%, 27/50) i finalment els animals estabulats, amb la seroprevalença del 50,0% (26/52). En les explotacions on s'hi realitzava la cria, la seropositivitat va ser superior (61,5%, 104/169) en comparació amb les explotacions que no es dedicaven a aquesta activitat (37,0%, 17/46). Respecte al contacte amb altres animals, els cavalls que convivia amb remugants a l'explotació van mostrar una seroprevalença lleugerament superior (63,0%, 58/92) en comparació amb els que no ho feien (51,2 %, 63/123). De la mateixa manera, els convivents amb carnívors i aviram la seva seropositivitat va ser del 57,5% (92/160) vs. 52,7 %, (29/55) pels no convivents, i 59,8 % (55/92) vs. 53,7 % (66/123), respectivament. Finalment, els cavalls amb possible contacte amb fauna salvatge van presentar una seroprevalença del 57,5 % (111/193), mentre que aquells sense potencial contacte els nivells van ser inferiors, concretament del 45,5 % (10/22). Un altre element a destacar va ser que els animals d'explotacions amb presència de paparres van tenir una seropositivitat del 57,4% (113/197), mentre que aquells cavalls allotjats en explotacions suposadament lliures de paparres la seva seropositivitat va resultar ser lleugerament inferior, 44,4% (8/18). En relació amb aquest últim fet, els individus amb antecedents de paparres en els darrers dos anys la seva seropositivitat va ser del 58,8 % (107/182), mentre que en aquells sense exposició coneguda, la seroprevalença va ser del 42,4 % (14/33). Finalment, els animals provinents d'explotacions amb antecedents de piroplasmosi equina van presentar una seropositivitat del 54,0 % (68/126) en comparació amb els individus sense antecedents, amb una seroprevalença del 59,6 % (53/89).

b. PREVALENÇA

La prevalença general per *Theileria equi* va ser del 19,5% (42/215), mentre que per *Babesia caballi* va ser del 0% (0/215).

Pel que fa a la distribució per municipis, la prevalença de *Theileria equi* va mostrar variacions entre els diferents municipis estudiats. Es Mercadal va presentar la prevalença més elevada (30,8%; 4/13), seguida de Ciutadella (25,9%, 22/85) i Alaior (25,0%, 3/12). En canvi, els municipis amb menor prevalença van ser Es Castell (5,6%, 1/18) i Ferreries (12,5%, 5/40). Maó (15,8%, 3/19) i Es Migjorn Gran (14,3%; 4/28) van presentar una prevalença intermèdia, tal com es pot veure en la **Figura 2**.

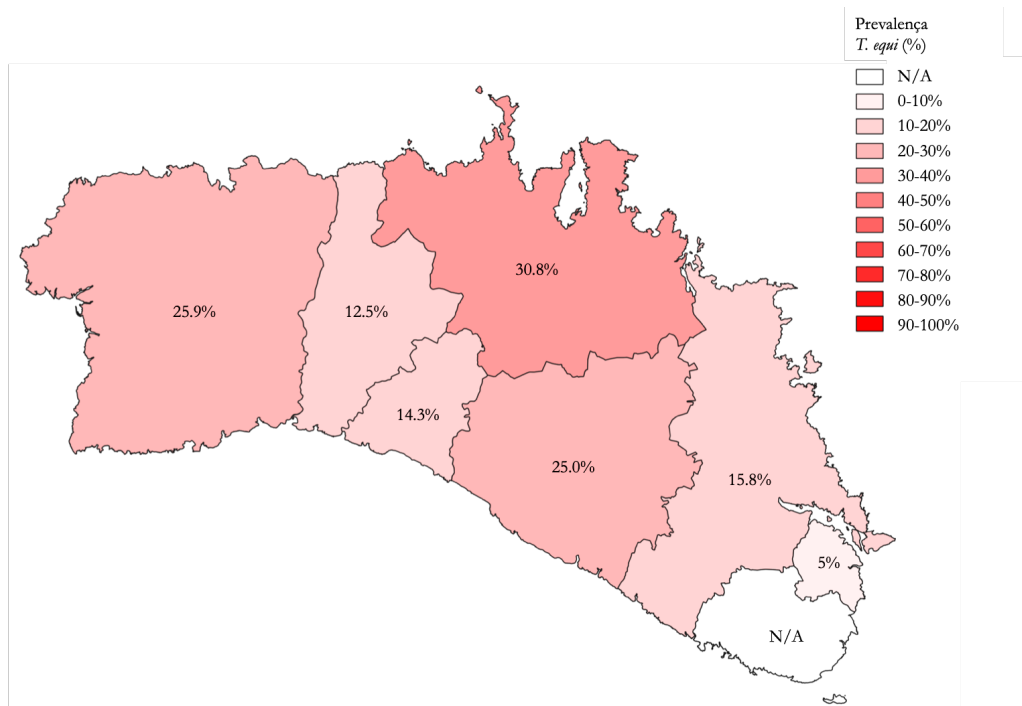


Figura 2. Mapa de Menorca que mostra la prevalença de *Theileria equi* en els diferents municipis de l'illa. Els colors representen diferents nivells de prevalença, amb tonalitats més intenses indicant valors més alts.

Respecte a les característiques intrínseques de l'individu com el sexe o l'edat, les femelles van presentar una prevalença superior (23,1%, 21/91) en comparació amb els mascles (16,9 %, 21/124). Respecte a l'edat, els pòltres van mostrar valors del 34,4 % (22/64), mentre que en els adults la positivitat va ser del 13,2 % (20/151).

En relació amb les condicions sanitàries i la supervisió dels animals, es va observar que els animals als quals se'ls realitzava una inspecció diària la prevalença era inferior (10,3%, 9/87) en comparació amb aquells sense aquesta pràctica (25,8%, 33/128). D'igual manera, els animals vacunats van mostrar una prevalença del 16,3% (25/153), mentre que aquells no vacunats van tenir una prevalença superior del 27,4% (17/62).

Finalment, i relacionat amb les condicions de maneig i les característiques de l'explotació, els animals en condicions de maneig lliures van presentar la prevalença més alta (25,7%, 29/113), seguits pels animals amb unes condicions d'allotjament mixtes (18,0%, 9/50) i finalment els animals estabulats, amb la prevalença més baixa (7,7%, 4/52). En les explotacions on es realitzava la cria la positivitat va ser superior (22,5%, 38/169) en comparació amb els animals allotjats en explotacions on no es dedicaven a aquesta activitat (8,7%, 4/46). Respecte al contacte amb altres animals, els cavalls que convivia amb remugants a l'explotació van mostrar una prevalença superior (25,0%, 23/92) en comparació amb els que no ho feien (15,4%, 19/123). De la mateixa manera, els convivents amb carnívors i aviram la seva positivitat va ser respectivament del 21,2% (34/160) vs. 14,5%, (8/55) pels no convivents, i 23,9% (22/92) vs. 16,3% (20/123). Finalment, els cavalls amb possible contacte amb fauna salvatge van presentar una prevalença del 21,2% (41/193), mentre que aquells sense potencial contacte els nivells van ser inferiors, concretament del 4,5% (1/22). Un altre element a destacar va ser que els animals d'explotacions amb presència de paparres van tenir una positivitat del 20,8% (41/197), mentre

que aquells cavalls allotjats en explotacions suposadament lliures de paparres la seva prevalença va resultar ser inferior, 5,6% (1/18). En relació amb aquest últim fet, els individus amb antecedents de paparres en els darrers dos anys van mostrar una prevalença del 21,4 % (39/182), mentre que en aquells sense exposició coneguda, la prevalença va ser del 9,1% (3/33). Finalment, els animals provinents d'explotacions amb antecedents de piroplasmosi van presentar una positivitat del 18,3% (23/126), mentre que aquells sense antecedents van tenir una prevalença del 21,3% (19/89).

c. FACTORS DE RISC ASSOCIATS A LA PIROPLASMOSI EQUINA

L'anàlisi multivariant va revelar diversos factors de risc associats a la seroprevalença de *Theileria equi*. En primer lloc, el municipi d'origen va mostrar diferències en la probabilitat de seropositivitat. En comparació amb Ferreries, els cavalls d'Es Migjorn Gran presentaven una probabilitat notablement més alta de ser seropositius (OR = 6,19; $p = 0,001$; IC 95%: 2,09–18,35), seguits dels de Ciutadella, que també mostraven un risc significativament elevat (OR = 7,58; $p = 0,002$; IC 95%: 2,17–26,53). De manera similar, els animals d'Es Mercadal van presentar un augment del risc (OR = 4,36; $p = 0,008$; IC 95%: 1,47–12,92), mentre que els d'Alaior també van mostrar una tendència a una major seroprevalença, tot i que sense assolir la significació estadística (OR = 3,29; $p = 0,151$; IC 95%: 0,65–16,74). En canvi, els animals de Maó i Es Castell no van mostrar una seroprevalença superior i estadísticament significativa en comparació amb el municipi de referència, en aquest cas Ferreries, amb la seroprevalença més baixa. Per altra banda, l'edat va ser un altre dels factors de risc determinants en el model. Els cavalls adults tenien una probabilitat significativament més alta de ser seropositius en comparació amb els poltres (OR = 7,16; $p < 0,001$; IC 95%: 3,10–16,52), fet que reforça la hipòtesi que l'exposició prolongada al paràsit incrementa el risc d'infecció en una zona endèmica com és el cas de Menorca. Pel que fa a les característiques de les explotacions, es va trobar una associació entre la seroprevalença i l'extensió de l'explotació, amb una relació directa entre una major superfície i una probabilitat més alta de seropositivitat (OR = 1,01; $p < 0,001$; IC 95%: 1,0049–1,0163). Això suggereix que factors ambientals o una exposició més gran a vectors podrien influir en la transmissió del patogen. Un altre factor rellevant va ser el contacte amb fauna salvatge. Els animals que tenien accés a zones amb presència d'animals silvestres presentaven una probabilitat significativament més alta de ser seropositius (OR = 3,89; $p = 0,001$; IC 95%: 1,79–8,45), reforçant la idea que aquests animals poden facilitar la presència de vectors transmissors. Per últim, les pràctiques sanitàries també van demostrar tenir un impacte en la seroprevalença. Els cavalls que rebien una desparasitació externa amb una freqüència igual o superior a cinc cops per any van mostrar una probabilitat significativament menor de ser seropositius (OR = 0,10; $p = 0,021$; IC 95%: 0,015–0,71), cosa que suggereix un efecte protector d'aquesta mesura en la reducció del risc d'infecció. En conjunt, aquests resultats indiquen que la seroprevalença de *Theileria equi* està influenciada per diversos factors, com ara el municipi d'origen, l'edat dels animals, l'extensió de l'explotació, el contacte amb fauna salvatge i la freqüència de desparasitació. Aquests elements han de ser considerats en l'establiment de mesures preventives i estratègies de control.

Pel que fa a la presència activa d'infecció durant el període de mostreig també es van poder identificar diverses variables rellevants. En primer lloc, el municipi de procedència es va associar amb diferències en la

probabilitat de donar positiu. Els cavalls de Ciutadella van mostrar un risc significativament més alt respecte a Es Castell, municipi de referència amb una prevalença més baixa, amb un OR de 9,14 ($p = 0,009$; IC 95%: 1,74–48,13). Així mateix, els animals d'Es Mercadal també van presentar una probabilitat elevada de positivitat (OR = 8,57; $p = 0,086$; IC 95%: 0,74–99,85), seguit d'Alaior (OR = 13,26; $p = 0,100$), tot i que aquests últims no van assolir el llindar de significació estadística. En canvi, els municipis de Ferreries, Es Migjorn Gran i Maó no van mostrar una associació clara amb la positivitat en comparació amb Es Castell, municipi, com ja s'ha anomenat anteriorment, amb la prevalença més baixa. Els poltres van mostrar una probabilitat significativament més alta de positivitat per PCR en comparació amb els adults (OR = 0,31; $p = 0,010$; IC 95%: 0,13–0,76), fet que suggereix una major presència d'infecció activa en individus joves durant l'època de mostreig. Pel que fa a les condicions de maneig i contacte amb altres animals, es van poder trobar també associacions destacables. Els cavalls que convivia amb carnívors van tenir un risc més elevat d'infecció (OR = 3,60; $p = 0,001$; IC 95%: 1,67–7,77), així com aquells en contacte amb aus (OR = 2,48; $p = 0,036$; IC 95%: 1,06–5,81). De la mateixa manera, els animals en contacte amb fauna salvatge van mostrar una probabilitat notablement superior de ser positius per PCR (OR = 8,76; $p = 0,052$; IC 95%: 0,99–77,92), tot i que aquest resultat es troba al límit de la significació estadística. D'altra banda, alguns factors van suggerir un efecte protector. Els animals estabulats van presentar una menor probabilitat de positivitat en comparació amb els que es trobaven en altres tipus de maneig, encara que la diferència no va ser estadísticament significativa (OR = 0,55; $p = 0,104$). Així mateix, la vacunació es va associar amb un risc reduït de positivitat per *Theileria equi* (OR = 0,32; $p = 0,028$; IC 95%: 0,12–0,88), fet que suggereix un possible efecte protector. Finalment, la freqüència de desparasitació externa també va tenir un paper potencialment protector. Els animals amb una freqüència de desparasitació externa de tres o més cops l'any van mostrar una probabilitat de positivitat significativament menor en comparació amb la resta de pràctiques (OR = 0,21; $p = 0,032$; IC 95%: 0,05–0,88). En conjunt, aquests resultats indiquen que la positivitat per *Theileria equi* mitjançant PCR està influenciada per factors com el municipi d'origen, l'edat, el contacte amb altres espècies animals, i les pràctiques sanitàries, especialment la vacunació i la desparasitació.

4. CONCLUSIONS

Aquest estudi ha proporcionat, per primer cop, una visió detallada de la situació epidemiològica i els factors de risc associats de la piroplasmosi equina en cavalls PRMe. Els resultats obtinguts suggereixen l'Illa com una zona endèmica i proporcionen informació rellevant per a la millora de les estratègies de prevenció i control.

D'una banda, els resultats de seroprevalença han revelat una exposició significativa a *Theileria equi* en la població estudiada, amb diferències notables entre municipis, fet que podria indicar una distribució heterogènia dels paràsits en funció de factors ambientals, geogràfics i de maneig. L'edat també es va confirmar com un factor determinant, suggerint una exposició acumulativa al llarg del temps. A més, altres variables com l'extensió de l'explotació i el contacte amb fauna salvatge es van associar amb un major risc d'infecció, mentre que una desparasitació externa freqüent es va relacionar amb una reducció de la seropositivitat. Pel que fa als nivells d'infecció activa durant el mostreig, es van observar patrons similars en relació amb la distribució geogràfica i altres factors de risc. No obstant això, es van identificar variables addicionals, com el contacte amb carnívors i aus, que podrien tenir un paper en la dinàmica de transmissió dels paràsits. Així mateix, la vacunació es va associar amb una menor probabilitat d'infecció així com també una freqüència de desparasitació externa igual o superior a tres cops a l'any.

Més enllà dels factors de risc, aquest estudi ha posat en relleu la necessitat d'una estratègia de control integrada que consideri tant aspectes individuals com ambientals. La presència dels paràsits arreu de l'Illa reforça la importància d'un seguiment epidemiològic continuat per comprendre millor la seva distribució i els mecanismes de transmissió. A més, els resultats suggereixen que la implementació de pràctiques com la desparasitació regular i la limitació del contacte amb fauna silvestre podria contribuir a reduir la circulació dels patògens i minimitzar-ne l'impacte en la població estudiada. Finalment, aquest estudi proporciona informació valuosa per al sector equí de Menorca i per als professionals veterinaris, destacant la importància d'un enfocament multidisciplinari per a la gestió d'aquesta malaltia. La combinació de mesures de prevenció, diagnòstic i control podria ser clau per reduir-ne la incidència i protegir la salut d'aquests animals que són part del llegat cultural, social i històric de l'illa de Menorca.

5. AGRAÏMENTS

Volem expressar el nostre més sincer agraïment a tots propietaris per la seva col·laboració i disponibilitat, així com als veterinaris Tània Garcia i Joan Vinent que han participat activament en les tasques de mostreig, aportant els seus coneixements i suport tècnic. En segon lloc, agrair també a tot l'equip de VISAVET per la seva tasca en la realització de les anàlisis laboratorials i en especial a Abel Dorrego. Finalment volem agrair de manera especial a l'Associació de Criadors i Propietaris de Cavalls de Pura Raça Menorquina pel seu compromís i implicació, facilitant l'accés i la coordinació necessària per al bon desenvolupament del projecte, i en especial a la Dra. Maria Dolores Gómez i Cristóbal Maqués, pel seu suport i implicació en el projecte.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Onyiche, T.E.; Suganuma, K.; Igarashi, I.; Yokoyama, N.; Xuan, X.; Thekisoe, O. A Review on Equine Piroplasmosis: Epidemiology, Vector Ecology, Risk Factors, Host Immunity, Diagnosis and Control. *Int J Environ Res Public Health* **2019**, *16*, doi:10.3390/ijerph16101736.
2. Rothschild, C.M. Equine Piroplasmosis. *J Equine Vet Sci* **2013**, *33*, 497–508, doi:10.1016/j.jevs.2013.03.189.
3. Camino, E.; Pozo, P.; Dorrego, A.; Carvajal, K.A.; Buendia, A.; Gonzalez, S.; de Juan, L.; Dominguez, L.; Cruz-Lopez, F. Importance of Equine Piroplasmosis Antibody Presence in Spanish Horses Prior to Export. *Ticks Tick Borne Dis* **2020**, *11*, 101329, doi:10.1016/j.ttbdis.2019.101329.
4. Camino, E.; de la Cruz, M.L.; Dominguez, L.; Carvajal, K.A.; Fores, P.; de Juan, L.; Cruz-Lopez, F. Epidemiological Situation of the Exposure to Agents Causing Equine Piroplasmosis in Spanish Purebred Horses in Spain: Seroprevalence and Associated Risk Factors. *J Equine Vet Sci* **2018**, *67*, 81–86, doi:10.1016/j.jevs.2018.03.012.
5. Camino, E.; Buendia, A.; Dorrego, A.; Pozo, P.; de Juan, L.; Dominguez, L.; Cruz-Lopez, F. Sero-Molecular Survey and Risk Factors of Equine Piroplasmosis in Horses in Spain. *Equine Vet J* **2020**, *53*, 771–779, doi:10.1111/evj.13348.
6. Tirosh-Levy, S.; Gottlieb, Y.; Fry, L.M.; Knowles, D.P.; Steinman, A. Twenty Years of Equine Piroplasmosis Research: Global Distribution, Molecular Diagnosis, and Phylogeny. *Pathogens* **2020**, *9*, 1–32, doi:10.3390/pathogens9110926.
7. Nardini, R.; Cersini, A.; Bartolomé Del Pino, L.E.; Manna, G.; Scarpulla, M.; Di Egidio, A.; Giordani, R.; Antognetti, V.; Veneziano, V.; Scicluna, M.T. Comparison of Direct and Indirect Methods to Maximise the Detection of Babesia Caballi and Theileria Equi Infections in Central Southern Italy. *Ticks Tick Borne Dis* **2022**, *13*, doi:10.1016/j.ttbdis.2022.101939.
8. Montes Cortés, M.G.; Fernández-García, J.L.; Martínez-Estélez, M.Á.H. Seroprevalence of Theileria Equi and Babesia Caballi in Horses in Spain. *Parasite* **2017**, *24*, doi:10.1051/parasite/2017015.
9. Camacho, A.T.; Guitian, F.J.; Pallas, E.; Gestal, J.J.; Olmeda, A.S.; Habela, M.A.; Telford, S.R.; Spielman, A. Theileria (Babesia) Equi and Babesia Caballi Infections in Horses in Galicia, Spain. *Trop Anim Health Prod* **2005**, *37*, 293–302, doi:10.1007/s11250-005-5691-z.
10. Sigg, L.; Gerber, V.; Gottstein, B.; Doherr, M.G.; Frey, C.F. Seroprevalence of Babesia Caballi and Theileria Equi in the Swiss Horse Population. *Parasitol Int* **2010**, *59*, 313–317, doi:10.1016/j.parint.2010.02.005.
11. Almazán, C.; Scimeca, R.C.; Reichard, M. V.; Mosqueda, J. Babesiosis and Theileriosis in North America. *Pathogens* **2022**, *11*, 1–21, doi:10.3390/pathogens11020168.
12. Graham, H.; van Kalsbeek, P.; van der Goot, J.; Koene, M.G.J. Low Seroprevalence of Equine Piroplasmosis in Horses Exported from the Netherlands between 2015 and 2021. *Front Vet Sci* **2022**, *9*, doi:10.3389/fvets.2022.954046.
13. Camino, E.; Cruz-Lopez, F.; de Juan, L.; Dominguez, L.; Shiels, B.; Coultous, R.M. Phylogenetic Analysis and Geographical Distribution of Theileria Equi and Babesia Caballi Sequences from Horses Residing in Spain. *Ticks Tick Borne Dis* **2020**, *11*, 101521, doi:10.1016/j.ttbdis.2020.101521.
14. García-Bocanegra, I.; Arenas-Montes, A.; Hernández, E.; Adaszek, Ł.; Carbonero, A.; Almería, S.; Jaén-Téllez, J.A.; Gutiérrez-Palomino, P.; Arenas, A. Seroprevalence and Risk Factors Associated with Babesia Caballi and Theileria Equi Infection in Equids. *Veterinary Journal* **2013**, *195*, 172–178, doi:10.1016/j.tvjl.2012.06.012.
15. Olvera-Maneu, S.; Carbajal, A.; Serres-Corral, P.; López-Béjar, M. Cortisol Variations to Estimate the Physiological Stress Response in Horses at a Traditional Equestrian Event. *Animals* **2023**, *13*, 396, doi:10.3390/ani13030396.