



DIAGNÓSTICO DE *Theileria equi* Y *Babesia caballi* EN EQUINOS Y MULARES DEL
MUNICIPIO DE QUETAME, CUNDINAMARCA (COLOMBIA)

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
BOGOTA D.C. JUNIO 2019



DIAGNÓSTICO DE *Theileria equi* Y *Babesia caballi* EN EQUINOS Y MULARES DEL
MUNICIPIO DE QUETAME, CUNDINAMARCA (COLOMBIA)

ESTUDIANTES:

Laura Camila Gutiérrez Sosa
Karen Julieth Jiménez Carrillo

ASESOR:

Johanna Marcela Moscoso Gama
Magister en ciencias biológicas

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
BOGOTA D.C. JUNIO 2019

“A través de las edades, el éxito ha sido de aquellos que perciben las necesidades
públicas y saben satisfacerlas”

Robert J. Shiller

“El éxito está compuesto por un cinco por ciento de inspiración y un noventa y cinco por
ciento de sudor”

Ralph Waldo Emerson

“Caballo al hablar de ti he de quitarme el sombrero
Respetar tu linaje no importa el color del pelo
Solo me importa que seas tesoro que desde el cielo
Nos mandó Dios pa’ poder decir que somos llaneros”

Cholo Valderrama

DEDICATORIA

Este trabajo de grado es dedicado a toda la comunidad del municipio de Quetame (Cundinamarca), por su apoyo y colaboración en el desarrollo del mismo. A nuestras familias quienes nos acompañaron incondicionalmente en cada una de las etapas de nuestro proceso educativo. A nuestros docentes por ser guías en el aprendizaje y crecimiento no solo como profesionales si no como personas. A los carabineros de la Policía Nacional por su apoyo, acompañamiento a la comunidad y protección incondicional de la integridad de todos los colombianos.

Karen Julieth Jiménez Carrillo – Laura Camila Gutiérrez Sosa

AGRADECIMIENTOS

Primordialmente a Dios por bendecirnos con la oportunidad de recibir una educación universitaria, por permitirnos llegar hasta este punto y por ser quien nos dio la perseverancia para llevar a cabo este trabajo. A nuestras familias por el apoyo incondicional, por el amor, por la guía y la educación en cada una de nuestras etapas, por ser nuestra compañía durante este proceso.

A la alcaldía del municipio de Quetame, su señor alcalde Wilder Enrique Moreno y el personal de la Unidad Tecnológica Agropecuaria (UTA) de dicha alcaldía, por el apoyo logístico e intelectual en cada una de las etapas de realización de esta investigación, en especial a los señores Edwin Mauricio Romero director de la UTA y Braian Fernando Olmos asistente técnico agropecuario. Al Criadero Caballar Mancilla de la Policía Nacional en especial al Teniente Hamith Leandro Vargas por su colaboración en la certificación en toma de muestra de equinos, además de su apoyo en la jornada de sanidad veterinaria junto con el Capitán Helbet Yesid León Silva Integrante del grupo de carabineros y guías caninos de Cundinamarca Policía Nacional.

A nuestros docentes por la guía en el desarrollo de este trabajo tanto intelectual, como metodológicamente en especial a Johanna Moscoso, William Méndez, Ingrid Pinillos, Susan Castro y Orlando Torres. Además de las bacteriólogas Estefanía Jiménez y Alexandra Guaqueta quienes nos orientaron y apoyaron en este proceso investigativo.

Karen Julieth Jiménez Carrillo – Laura Camila Gutiérrez Sosa

CONTENIDO

RESUMEN	15
INTRODUCCIÓN.....	17
1. ANTECEDENTES	19
1.1. OBJETIVOS.....	22
1.1.1. Objetivo general	22
1.1.2. Objetivos específicos.....	22
2. MARCO REFERENCIAL	23
2.1. GENERALIDADES	23
2.2. ESPECIES.....	23
2.2.1. <i>Babesia caballi</i>	23
2.2.2. <i>Theileria equi</i>	24
2.3. FISIOPATOLOGÍA.....	25
2.3.1. Signos y síntomas clínicos	26
2.3.2. Morbi mortalidad.....	27
2.4. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN.....	27
2.4.1. Principales vectores	29
2.4.2. Prácticas pecuarias	30
2.5. TRATAMIENTO	31
2.6. PROFILAXIS.....	31
2.7. DIAGNÓSTICO.....	32
2.7.1. Métodos directos	32
2.7.2. Indirectos.....	33
2.8. EPIDEMIOLOGÍA	33
3. DISEÑO METODOLÓGICO	36
3.1. TIPO DE ESTUDIO.....	36
3.2. UNIVERSO, POBLACIÓN, MUESTRA.....	36
3.2.1. Universo	36
3.2.2. Población.....	36
3.2.3. Muestra	36
3.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	36

3.4. VARIABLES	37
3.5. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	37
3.5.1. Metodología.....	37
3.5.2. Capacitación y prueba piloto	41
3.5.3. Jornada de sanidad veterinaria	46
3.5.4. Adecuación de la muestra	54
3.5.5. Frotis de sangre periférica.....	54
3.5.6. ELISA	56
3.5.7. Análisis estadístico.....	63
4. RESULTADOS	64
4.1. MUESTRAS	64
4.2. FROTIS DE SANGRE PERIFÉRICO.....	66
4.3. VARIABLES	70
4.4. ELISA.....	73
4.4. RESULTADOS SEGÚN ELISA Y FSP	73
5. DISCUSIÓN.....	76
6. CONCLUSIONES.....	79
7. RECOMENDACIONES	81
8. ESTRATEGIA DE COMUNICACIÓN	82
8. REFERENCIAS.....	83
9. ANEXOS	89

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales especies de garrapatas trasmisoras según el parásito del cual son portadoras (28).....	29
Tabla 2. Variables para el análisis de resultados (Autoras).....	37
Tabla 3. Procedimiento para la recolección de muestra en equinos y mulares (Autoras). Fotografías autoras.	42
Tabla 4. Procedimiento para la realización de ELISA competitiva para la detección de anticuerpos tipo IgG (Autoras). Fotografías de autoras.....	58
Tabla 5. Características de la población según sexo y especie (Autoras).....	66
Tabla 6. Frecuencia de parásitos según las variables (Autoras).	71
Tabla 7. Distribución de muestras positivas según vereda en la cual residen (Autoras).	71
Tabla 8. Resultados detección de Ac tipo IgG contra <i>Theileria equi</i> y <i>Babesia caballi</i> mediante ELISA competitiva (Autoras).....	73

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 1. Numero de muestras recolectadas pertenecientes a las distintas veredas del municipio (Autoras).....	64
Gráfica 2. Porcentaje de diagnósticos obtenidos de la observación de FSP (Autoras). 66	
Gráfica 3. Porcentaje de parásitos causantes de piroplasmosis encontrados en los FSP (Autoras).....	68
Gráfica 4. Alteraciones evidenciadas en los FSP analizados (Autoras).	68
Gráfica 5. Resultados de los análisis para la detección de los parásitos mediante FSP Y ELISA (Autoras).....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Merozoitos de <i>Babesia caballi</i> dentro de hematíes en frotis de sangre periférico (23).....	23
Figura 2. Merozoitos de <i>Theileria equi</i> dispuestos en forma de cruz, dentro de hematíes en frotis de sangre periférico (23).....	24
Figura 3. Ciclo biológico del parásito (Autoras).....	28
Figura 4. Garrapatas del género A. <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> ; B. <i>Anocentor nitens</i> C. <i>Amblyomma cajjenense</i> ; y D. <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (19).....	30
Figura 5. Distribución de Piroplasmosis a nivel mundial para el año 2018 (38).....	34
Figura 6. Número de casos reportados por departamento en Colombia entre los años 2017 y 2018. Reporte de la WAHIS, Datos de la salud animal mundial (40).....	35
Figura 7. Carabineros y equinos de Cundinamarca, Policía Nacional de Colombia (Autoras).....	38
Figura 8. Mapa municipio de Quetame, Cundinamarca. Ubicación de veredas seleccionadas (41).....	39
Figura 9. Diagrama de actividades (Autoras).....	40
Figura 10. Criadero Caballar Mancilla – Policía Nacional de Colombia (Autoras).....	41
Figura 11. Resultados prueba piloto en el Criadero Caballar Mancilla (Autoras).....	45
Figura 12. Jornada sanidad apoyo UCMC, carabineros de la Policía y Uta de la alcaldía (42).....	46
Figura 13. Desparasitación de equino (Autoras).....	47
Figura 14. Toma de muestra de sangre en tubo tapa roja (Autoras).....	47
Figura 15. Toma de muestra y posterior consulta médica médicos veterinarios Criadero Caballar Mancilla (Autores).....	47
Figura 16. Dificultad en toma de muestra. Apoyo entre personal idóneo para el manejo del animal (Autoras).....	48
Figura 17. Servicio portátil de herraje de la Policía (Autoras).....	48
Figura 18. Acogida a la jornada de sanidad veterinaria vereda Estaqueca (Autoras).....	49
Figura 19. Toma de muestra de sangre a mular de la vereda Estaqueca (Autoras).....	49
Figura 20. Entrega recomendaciones médicas del médico veterinario (Autoras).....	50
Figura 21. Consulta médico veterinario Criadero Caballar Mancilla (Autoras).....	50
Figura 22. Desparasitación de equino (Autoras).....	51
Figura 23. Punción Yugular para toma de muestra a mular con apoyo de la comunidad de Tibrote bajo (Autoras).....	51
Figura 24. Toma de muestra en equino de la vereda Chilcal bajo (Autoras).....	52
Figura 25. Inspección dental previa punción facial (Autoras).....	52
Figura 26. Muestras recolectadas en tubos tapa lila y tapa amarilla (Autoras).....	53
Figura 27. Recepción de datos para diligenciar la encuesta a cada propietario (Autoras).....	53
Figura 28. Separación de sueros de las muestras en tubos Eppendorf (Autoras).....	54

Figura 29. Pasos para la elaboración de la lámina para FSP (Autoras).	55
Figura 30. Esquema para la coloración de la lámina mediante tinción de Wright (Autoras).....	56
Figura 31. Esquema del fundamento de la técnica ELISA de tipo competitivo (Autoras).	57
Figura 32. A. luego del reconocimiento del parásito, los Linfocitos B ₁ producen IgM, el pico máximo de esta se encuentra en los días 4 – 8 post infección. B. En los días 20 – 30, se cursa por una etapa de ventana inmunológica, donde los títulos de IgM van disminuyendo hasta desaparecer y se comienza la producción de IgG, debido a ello sus títulos son indetectables. C. En esta etapa la IgG realiza un pico para luego decaer y mantenerse constante de por vida. D. En una reinfección los linfocitos B ₂ producen IgM, pero en menor concentración que en la primo infección y la IgG incrementa hasta que se elimina el parásito, disminuye de nuevo y vuelve a su concentración constante (Autoras).....	75
Figura 33. Entrega de resultados y socialización ante el consejo del municipio y el personal de la UTA (Autoras).	82
Figura 34. Entrega de resultados y recomendaciones a los propietarios por parte del médico veterinario de la UTA (Autoras).....	82
Figura 35. Socialización de los resultados y capacitación frente a la enfermedad por parte de la UTA a la comunidad rural (Autoras).	82

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Encuesta: Diagnostico de piroplasmosis equinos y mulares del municipio de Quetame.....	89
Anexo 2. Guía para prueba de ELISA competitiva para la detección de anticuerpos con Kit comercial.....	90



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA

DIAGNÓSTICO DE *Theileria equi* Y *Babesia caballi* EN EQUINOS Y MULARES DEL MUNICIPIO DE QUETAME, CUNDINAMARCA (COLOMBIA)

RESUMEN

La piroplasmosis es causada por *Theileria equi* y *Babesia caballi*, hematozoarios intraeritrocitarios que generan lisis en los glóbulos rojos, desencadenando síntomas como fiebre, anemia, hemoglobinuria y la muerte. De allí, la importancia de hacer control de dicha enfermedad en Colombia. Por ello, el objetivo de esta investigación fue realizar el diagnóstico de piroplasmosis en equinos y mulares del municipio de Quetame (Cundinamarca). Se seleccionaron 4 veredas del municipio para realizar jornadas de sanidad apoyadas por el personal del Criadero Caballar Mancilla de la Policía Nacional, la Unidad Tecnológica Agropecuaria (UTA) y estudiantes de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Se recolectaron 105 muestras de sangre en equinos y mulares, que se analizaron mediante Frotis de Sangre periférica (FSP) y Ensayo de inmunoadsorción por enzimas (ELISA). En los FSP se detectó un caso de tripanosomiasis, 7 con alteraciones en los porcentajes de los leucocitos y 11 con piroplasmosis, de las cuales 5 estaban infectadas con *Theileria equi*, 4 con *Babesia caballi* y 2 con coinfección. Se analizaron estos 11 positivos mediante ELISA para la detección de anticuerpos IgG contra *Theileria equi* y *Babesia*

caballi, donde solo 4 resultaron positivos, contrario a los resultados de FSP. Se encontró que, no hay relación con el sexo o especie para el contagio de la enfermedad, la importancia del FSP como una herramienta de diagnóstico y la existencia de falencias en la prueba de ELISA ya que esta no detecta fases tempranas de la enfermedad o periodos de ventana inmunológica.

PALABRAS CLAVES

Piroplasmosis, Quetame, FSP, ELISA, Garrapatas, Protozoarios, Equinos, Mulares.

ESTUDIANTES:

Laura Camila Gutiérrez Sosa, Karen Julieth Jiménez Carrillo

DOCENTE:

Johanna Marcela Moscoso Gama

Junio, 2019

INTRODUCCIÓN

La piroplasmosis es una patología de distribución mundial causada por hematozoarios intraeritrocitarios de los géneros *Babesia* y *Theileria*. Estos son capaces de infectar a humanos, caninos, equinos y otras especies animales, ocasionalmente se reportan casos de transmisión zoonótica debido al constante contacto que tiene el ser humano con los animales^{1,2}. Durante la evolución de esta enfermedad se pueden evidenciar signos clínicos variados desde fiebre, malestar, dificultad respiratoria, inapetencia hasta anemia y hematuria, sintomatología muy común en múltiples patologías. Esta infección es causada por *Babesia caballi* y *Theileria equi* (antes denominada *Babesia equi*) transmitidos por la picadura de garrapatas y por malas prácticas pecuarias como lo son el uso compartido de agujas de vacunación o de instrumentos quirúrgicos³. Una vez la garrapata ingiere sangre de un espécimen infectado esta se vuelve vector, quien al picar a otro espécimen lo contagia del parásito propagando de esta manera la enfermedad, siendo así un problema sanitario para la población en general y en mayor proporción en regiones tropicales.

El diagnóstico de la piroplasmosis se hace mediante el análisis del frotis de sangre periférico (FSP), o por métodos mucho más sensibles como lo son el ensayo de inmunoadsorción por enzimas (ELISA), Inmunofluorescencia, pruebas de fijación de complemento o análisis mucho más específicos mediante biología molecular.

Colombia cuenta con una amplia población de equinos y mulares de la cual se desconoce su número exacto, además de la poca información epidemiológica de las enfermedades que los afectan. A pesar de ello, es poco común que estos animales sean sometidos a análisis poblacionales y de diagnóstico clínico, debido al desconocimiento que se tiene en general frente a las patologías y al poco control del propietario frente a la salud del animal. A pesar de la importancia de la piroplasmosis no se reportan muchos casos en nuestro país a menudo por la falta de análisis diagnósticos o por ser confundida con otras patologías. Es importante mencionar que actualmente el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) definió como requisito para importación o exportación de equinos pruebas diagnósticas con resultados negativos para dicha enfermedad⁴. Según el boletín de sanidad del ICA del año 2015,

Cundinamarca movilizó más de 80.000 ejemplares, siendo el departamento con mayor número de movilizaciones por encima de Antioquia⁵.

El municipio de Quetame se encuentra localizado en el departamento de Cundinamarca limitando al norte con el municipio de Fómeque, al occidente con Fosca y Cáqueza, al oriente con el departamento del Meta y al sur con el municipio de Guayabetal. Cuenta con una población rural del 80% y del área urbana 20%. En este municipio la tenencia de equinos y mulares, va enfocada al trabajo, transporte, y en un pequeño porcentaje a la exhibición⁵. Por estos motivos en este estudio se buscó la presencia de *Babesia caballi* y *Theileria equi* en equinos y mulares de veredas pertenecientes al municipio de Quetame (Cundinamarca), mediante la realización de análisis de FSP y ELISA de tipo competitivo. Debido a que, como anteriormente se menciono esta es una enfermedad tiene alta prevalencia en países tropicales como Colombia, por ser un municipio ubicado dentro del departamento de Cundinamarca. Además, este tipo de análisis no se han realizado previamente en dicho lugar.

1. ANTECEDENTES

Los parásitos causantes de la babesiosis fueron descritos por primera vez en Rumania en 1888 por Víctor Babes, quien determinó que esta enfermedad se desarrollaba con cuadros febriles, episodios de anemia y decaimiento hasta llevar a la hemoglobinuria y la muerte⁷.

En 1926 esta patología fue encontrada en mapaches, posteriormente se hicieron reportes de babesiosis humana detallada en el año 1957. En 1981 se realizó la descripción de pequeños piroplasmas, los cuales son protozoos intracelulares del orden *Piroplasmida*. En 1983 se realizó la confirmación serológica de babesiosis humana en New York⁸.

En el año 1998 *Babesia equi* fue reclasificada a *Theileria equi*, ya que esta invade primero los leucocitos a diferencia de *Babesia caballi* que irrumpe inicialmente en los hematíes⁹.

Para el año 1975 se realizó la comparación de casos de equinos enfermos en etapa de parasitemia por *Babesia equi* con caballos aparentemente normales con serología negativa. Se realizó la inoculación de *Babesia spp*, a los equinos sanos obteniendo en ellos cambios en el recuento diferencial de leucocitos, siendo notoria la monocitosis, eosinopenia y el aumento de fibrinógeno¹⁰.

En el 2004 en Argentina se describieron dos casos de babesiosis clínica que se dieron en diciembre del 2002 y enero del 2003. Estos en dos hembras menores de 3 años que murieron alrededor de las 24 horas posteriores al desarrollo de los síntomas. El diagnóstico fue realizado por medio de la tinción de Giemsa, donde se observó *Babesia caballi* y *Babesia equi*, que posteriormente se confirmó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)¹¹.

Para el 2006 en Valencia (Venezuela) se determinó la seroprevalencia de babesiosis equina y la identificación por especie de la misma. Este estudio se hizo en caballos del hipódromo Nacional, analizando los FSP mediante la tinción de Giemsa e inmunofluorescencia indirecta; donde se encontró una mayor seroprevalencia para

Theileria equi (15,2%) que para *Babesia caballi* (11.1%). Se concluye que la dilución 1:40 genera mayor positividad, y en el frotis no encontraron presencia de ningún parásito¹².

En las sabanas del Departamento de Casanare para el año 2007, se desarrolló un estudio en 4 fincas ubicadas en los municipios de Yopal, Agua azul, Maní y Paz de Ariporo. Donde se muestrearon 10 equinos mayores de 3 años de edad a los cuales se les hizo medición de hematocrito, proteínas totales séricas, recuento diferencial de leucocitos y ectoparásitos; con el fin de determinar la prevalencia de hemoparásitos. Como resultado se encontró que *Babesia spp* tenía la mayor prevalencia con un 12.5%¹³.

Para el 2010 en Grecia se llevó a cabo el estudio de piroplasmosis a través del ensayo de hibridación por transferencia de línea inversa (RLB) de genotipos diferentes; donde 7 muestras dieron débiles señales, es decir, que presentan bajos niveles de parasitemia, de igual forma se demostró un polimorfismo dentro de la población¹⁴.

En el 2010 se efectuó el diagnóstico de *Theileria equi* y *Babesia caballi* en 35 muestras de médula ósea de portadores asintomáticos mediante PCR, donde se hallaron tres muestras de caballos aparentemente sanos positivas para *Theileria equi*, y una de ellas con coinfección con *Babesia caballi*, concluyendo que la médula ósea es reservorio del parásito en caballos asintomáticos. Además, la existencia de coinfección por dichos parásitos¹⁵.

Un estudio realizado en el municipio de Montería, Córdoba (Colombia) en el año 2013, donde se recolectaron 126 muestras de sangre de equinos de seis pesebreras para su posterior análisis mediante la determinación de hematocrito y coloración de Wright, con el fin de hallar la frecuencia de la babesiosis. Teniendo en cuenta diferentes variables que podrían predisponer al animal para desarrollar la piroplasmosis por el contagio con los parásitos, como lo son el sistema de alimentación, edad, sexo, color y raza. Por lo tanto, se evidenció que el 18,25% de las muestras resultaron positivas para *Babesia spp*, además se llegó a la conclusión de la necesidad de implementar un programa integral de control de vectores¹⁶.

En el estado de Veracruz México para el año 2015, se recolectaron durante 6 meses 364 muestras de caballos sin distinción de sexo; el diagnóstico serológico se llevó a cabo mediante inmunoensayo de ELISA, en el cual se encontró una prevalencia del 84.3% para *Theileria equi* y del 74.4% *Babesia caballi*. Resaltando así los factores asociados para dicha infección, teniendo en cuenta la convivencia con bovinos, el control de parásitos y la labor desempeñada por el ejemplar. Se concluye que la infección está directamente relacionada con el tiempo de exposición con el vector y las funciones zootécnicas del ejemplar¹⁷.

Posteriormente en un estudio realizado en el 2017 en cinco regiones de España se recolectaron 3100 muestras de caballos sanos, evidenciándose una seroprevalencia global del 52%, el 44% en *Theileria equi* y 21% en *Babesia caballi*. Concluyendo la existencia de una relación directa entre la ubicación geográfica, edad y raza con la seroprevalencia, además de la necesidad de identificación de una técnica adecuada para el diagnóstico de piroplasmosis¹⁸.

Luego en el 2017 un estudio realizado en cinco municipios de Río de Janeiro, se tomaron muestras de 121 equinos, siendo clasificados según su sistema de Crianza. Los cuales eran confinado, semi confinada y extensivo; en dichas muestras se realizó FSP, para al final encontrarse con 31 láminas positivas para *Theileria equi* y 3 para *Babesia caballi*¹⁹.

En Italia para el 2017 se realizó el estudio de la prevalencia y de los factores de riesgo para la infección de piroplasmosis, donde por medio de la PCR establecieron la prevalencia de 23 caballos infectados de un total de 135 caballos de 7 diferentes establos. Donde *Theileria equi* obtuvo mayor prevalencia con 18 animales positivos²⁰.

En el año 2018 se realizó una investigación en el departamento de Antioquia (Colombia), en los municipios del Valle de Aburrá y Rionegro, para determinar la prevalencia de babesiosis y factores de riesgo para la presentación de seropositividad. Tomaron como población 1008 equinos en 223 predios, tomando sangre venosa para el diagnóstico serológico y molecular, en este estudio encontraron una prevalencia del 11.9% donde los principales factores de riesgo fueron la ubicación geográfica, el sexo,

estar castrado, ser positivos a Anemia Infecciosa Equina (AIE), estrongílicos u oxiurus²¹.

En el año 2018, en los municipios antioqueños de Barbosa, Bello, Caldas, Copacabana, Envigado, Girardota, Itagüí, La Estrella Medellín, Sabaneta y Rionegro, se realizó el análisis para la determinación de la prevalencia de piroplasmosis y otras enfermedades en equinos que afectan directamente la economía y producción. Con el fin de plantear un plan sanitario para el control de estas enfermedades, donde muestrearon un total de 1005 ejemplares, efectuando análisis por medio de la PCR. Al final del proceso se evidencio que el 11.6% de las muestras eran positivos para piroplasmosis en el 24.2% de predios positivos²².

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

Diagnosticar la infección por *Babesia caballi* y *Theileria equi* en equinos y mulares de la cabecera municipal, las veredas Estaqueca, Chilcal bajo y Tibrote bajo del municipio de Quetame del departamento de Cundinamarca (Colombia), mediante el análisis de FSP y ELISA.

1.1.2. Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia de la piroplasmosis en la cabecera municipal, las veredas Estaqueca, Chilcal bajo y Tibrote bajo del municipio de Quetame del departamento de Cundinamarca (Colombia)
- Identificar casos de coinfección por *Theileria equi* y *Babesia caballi* en la cabecera municipal, las veredas Estaqueca, Chilcal bajo y Tibrote bajo del municipio de Quetame del departamento de Cundinamarca (Colombia)
- Correlacionar los resultados obtenidos en el FSP y el ensayo de ELISA.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. GENERALIDADES

La piroplasmosis equina es una enfermedad transmitida generalmente por garrapatas y en algunas ocasiones por malas prácticas pecuarias. Es causada por *Theileria equi* y *Babesia caballi*, los cuales son protozoos intraeritrocitarios. Estos causan lisis en los glóbulos rojos, desencadenando sintomatología variada como lo es fiebre, anemia, ictericia, hepatomegalia, edema, hemólisis intravascular, hemoglobinuria que pueden llevar hasta la muerte al animal¹⁶.

2.2. ESPECIES

2.2.1. *Babesia caballi*

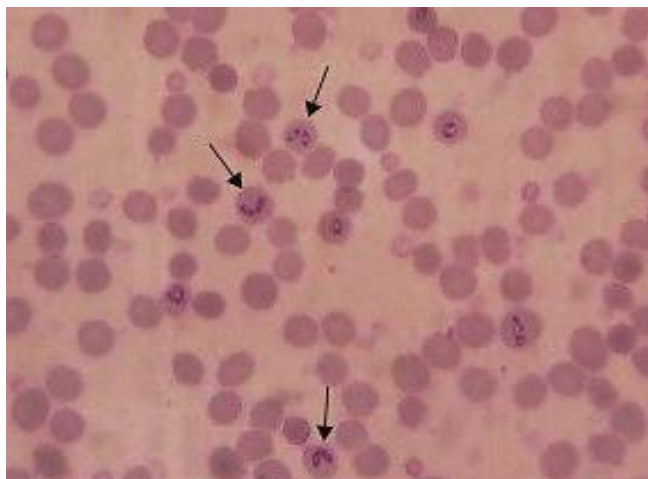


Figura 1. Merozoitos de *Babesia caballi* dentro de hematíes en frotis de sangre periférico (23).

Babesia caballi es un parasito de tipo intracelular con afinidad a los glóbulos rojos, perteneciente al filo *Apicomplexa*, clase *Aconoidasida*, orden *Piroplasma*, Familia *Babesiidae* y genero *Babesia*. En los eritrocitos los merozoitos son piriformes, tienen una longitud aproximada de 2–5 μm y su diámetro es de 1,3–3,0 μm . Se forman

en pares unidos por sus extremos terminales, los cuales son propios de *Babesia caballi* debido a esta característica, se distinguen para ser diagnosticados.

Los esporozoítos de *Babesia caballi* son los encargados de la infección a los eritrocitos. Allí se transforman en trofozoítos, crecen y se dividen en dos merozoítos redondos, ovoides o piriformes. Los merozoítos maduros son los encargados de infectar a nuevos eritrocitos, reiniciando así el proceso de división²⁴.

2.2.2. *Theileria equi*

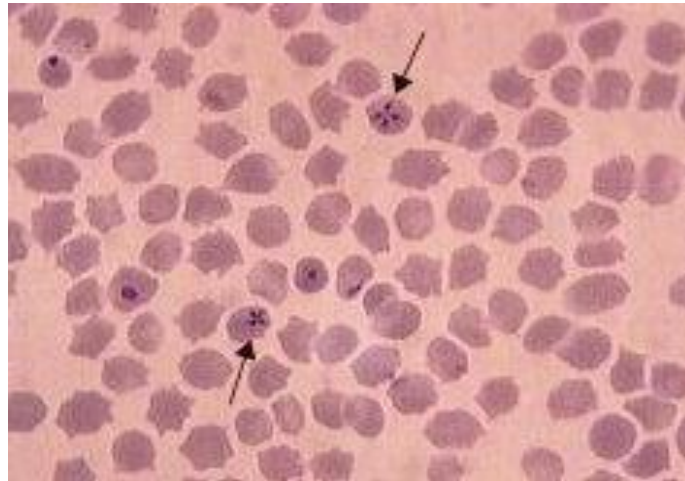


Figura 2. Merozoítos de *Theileria equi* dispuestos en forma de cruz, dentro de hematíes en frotis de sangre periférico (23).

Theileria equi es un parasito de tipo intracelular con afinidad a los glóbulos rojos, perteneciente al filo *Apicomplexa*, clase *Aconoidasida*, orden *Piroplasma*, Familia *Theileriidae* y genero *Theileria*. Anteriormente era conocida como *Babesia equi*, pero fue reclasificada a *Theileria equi*, gracias a la caracterización filogenética basada en secuencias de ARN ribosomal de la subunidad pequeña nuclear (ADNr 18s). Dicho gen, muestra que lo que se denominaba anteriormente como *Babesia* pequeña, está más relacionadas con *Theileria spp.*

Los merozoítos de *Theileria equi*, tienen una longitud inferior de 2 a 3 μm son piriformes, redondos u ovoides. Generalmente se encuentran juntos cuatro parásitos formando una tétrada conocida como la cruz de Malta²⁴. Al igual que *Babesia caballi* el esporozoíto invade el eritrocito y pasa a su estadio de trofozoíto, convirtiéndose este en merozoítos siendo este una característica clave para su diagnóstico. *Theileria equi* es

capaz de invadir los linfocitos y estas formas pasan a ser esquizontes que infectan eritrocitos y continúan su ciclo celular.

2.3. FISIOPATOLOGÍA

La piroplasmosis equina tiene un periodo de incubación que varía entre 12 a 19 días en *Babesia caballi* y de 10 a 30 días en *Theileria equi*. *Babesia caballi* libera esterasas que activan la calicreína (amina biógena), la cual produce alteraciones a nivel circulatorio presentándose vasodilatación, incremento de la permeabilidad vascular, éxtasis circulatorio, shock y posiblemente la muerte del animal, además de procesos hemolíticos¹⁶.

La acción de *Theileria equi* se basa en el sistema mononuclear fagocítico en la fase linfoproliferativa donde provoca anemia severa siendo esta la mayor afección debido a los elevados niveles de parasitemia. En ambos casos están presentes los procesos autoinmunes, acompañados por fenómenos de eritrofagocitosis¹⁶.

Babesia caballi y *Theileria equi* provocan un estrés metabólico en los glóbulos rojos, desencadenando hipofosfatemia y debilitamiento de las membranas de los eritrocitos dando como resultado la hemólisis. Tanto la hemólisis como la presencia de haloparásitos producen activación del complemento y la liberación de mediadores inflamatorios, incluyendo bradiquinina, histamina y 5-hydroxytryptamina. La mayoría de estas tienen efecto pirógeno provocando la fiebre característica de los animales con piroplasmosis Equina¹⁷.

De igual forma la lisis de los glóbulos rojos produce hemoglobinemia, hiperbilirrubinemia, ictericia, hemoglobinuria, especialmente en infecciones con *Theileria equi*; conllevando a una reducción de la capacidad de los eritrocitos para oxigenar a todos los tejidos del cuerpo del animal, aumentando así la respiración y la frecuencia cardiaca. Se genera una disminución del hematocrito, presentación de anemia hemolítica regenerativa con médula ósea hiperproliferativa. En algunos casos las células afectadas se agrupan en pequeños vasos y capilares obstruyendo el flujo normal de sangre causando Coagulopatía Intravascular Diseminada (CID), estos acúmulos de eritrocitos al ser filtrados por el riñón pueden causar falla renal²⁵.

En algunos casos los parásitos migran a retículo endotelial, debido a la respuesta inmunológica y quedan fijados en los tejidos por medio del sistema monocito-macrófago; por lo cual se hace difícil su diagnóstico por medio de FSP.

2.3.1. Signos y síntomas clínicos

Los signos clínicos de la piroplasmosis son inconstantes y generalmente no son específicos. La infección por *Theileria equi* se caracteriza por cursar un cuadro clínico más grave que el causado por *Babesia caball*²⁶. Los síntomas más característicos de esta enfermedad son:

- Hipertermia: el proceso se inicia con 39-42°C. En *Babesia caball* es persistente y en *Theileria equi* es intermitente
- Depresión y apatía
- Anorexia con pérdida de peso progresiva.
- Taquicardia: 80-100 p.p.m.
- Disnea
- Rinorrea
- Lagrimeo intenso
- Sialorrea
- Anemia hemolítica
- Hemoglobinuria
- Ictericia
- Bilirrubinuria
- Cojeras y parálisis del tercio posterior (por afección del sistema nervioso central)
- Edema de la cabeza, palpebral y de partes ventrales tales como extremidades, genitales y subcutáneo en abdomen)
- Hemorragias en mucosa nasal, vaginal, conjuntiva, además de petequias
- Trastornos gastrointestinales como cólicos y diarreas
- Síntomas bronconeumónicos derivados del edema de pulmón
- Abortos: Frecuente en *B. equi* por su transmisión intrauterina en el caballo
- Síntomas de insuficiencia renal

- Muerte: 10-50%. Menor en *Babesia caballi*

En algunos casos la infección cursa inaparente, ya sea debido a una baja parasitemia o que el espécimen es portador asintomático. Estos animales en situaciones de estrés o inmunosupresión generaran el cuadro sintomatológico.

La piroplasmosis híper aguda es ocasionada por *Theileria equi*, durante ésta los parásitos se reproducen en los eritrocitos provocando lisis celular y la muerte súbita, se presenta principalmente en crías recién nacidas cuya infección se da vía intrauterina. Los caballos afectados presentan edema en la región ventral y en miembros posteriores, hemorragia, isquemia y anoxia, que culmina en falla orgánica múltiple y muerte del individuo¹⁷. En la fase aguda *Theileria equi* presenta fiebre intermitente, letargia, anorexia, deshidratación, pérdida de peso, edema periférico y supra orbital, lagrimeo, sudoración, trombocitopenia (petequias y equimosis), taquipnea, hemoglobinuria, anemia, insuficiencia renal o hepática aguda, problemas del tracto gastrointestinal, respiratorio, y sistema nervioso central.

La fase crónica de la piroplasmosis tiene signos y síntomas inespecíficos, tales como la disminución del apetito, bajas en el rendimiento físico, disminución de peso y anemia. En este caso los signos clínicos son similares a los signos presentes en anemia infecciosa equina. Además, la esplenomegalia es común en la piroplasmosis crónica provocada por hemólisis extravascular en el bazo, generándose una disminución de glóbulos rojos, concentración de hemoglobina y prolongación en los tiempos de coagulación¹⁷.

2.3.2. Morbi mortalidad

En países tropicales la piroplasmosis se puede desarrollar durante todo el año, pero en países de clima estacionario es más frecuente en época de verano. Los índices de casos mortales informados para piroplasmosis equina es variante, debido a la falta de reporte de la enfermedad o su equivoco diagnóstico; se calcula que el índice de mortalidad varia de menos de 10% hasta un 50%⁶.

2.4. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

Esta infección se desencadena por la inoculación de los esporozoítos en el torrente sanguíneo del animal mediante la picadura de la garrapata, una vez allí invaden los glóbulos rojos, y se transforman en trofozoítos que se dividen en dos merozoítos ovales, siendo capaces de infectar otros glóbulos rojos siguiendo así su proceso de replicación. *Babesia caballi* y *Theileria equi* difieren entre ellas en su ciclo de multiplicación, lo cual hace que su transmisión varíe dependiendo de esto.

En la garrapata, los cigotos de *Babesia caballi* se multiplican como ‘vermiculos’ los cuales invaden la mayoría de los órganos de la garrapata, *Babesia caballi* pasa a la siguiente generación de garrapatas en el huevo llevándose a cabo transmisión transovárica, debido a la invasión del ovario en la garrapata. Cuando una garrapata en diferente estadio ya sea de larva, ninfa o adulta de la generación siguiente se adhiere a un nuevo huésped, el parásito es estimulado para que llegue a su maduración final, lo que le permite infectar al huésped. En *Theileria equi* los cigotos no se multiplican en la garrapata y no posee transmisión transovárica¹⁷.

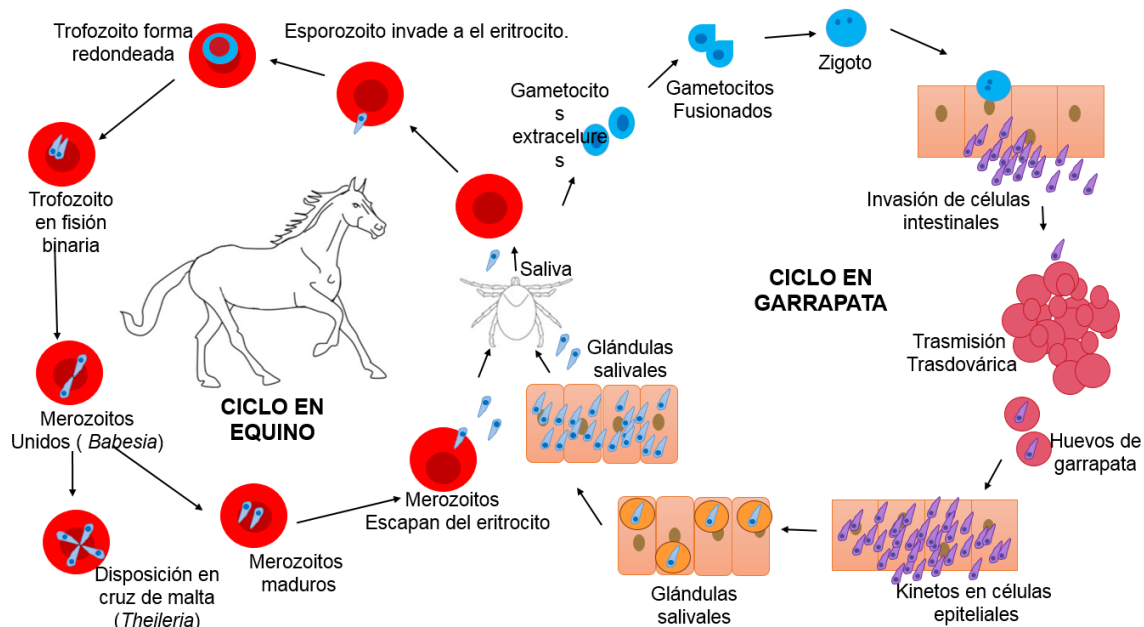


Figura 3. Ciclo biológico del parásito (Autoras).

Estas también poseen transmisión transestadial, en donde las garrapatas pueden transmitir el microorganismo en estadio adulto o como ninfa y estas mismas se pueden infectar con estos dos mismos estadios. En el caso de las garrapatas de la especie *Rhipicephalus microplus* poseen transmisión intraestadial, es decir que esta puede

transmitir el parásito en el mismo estadio con el que se infectó. La mayoría de las garrapatas infectadas pierden los parásitos después de infectar a los caballos; estas se pueden encontrar en el heno, los lechos, los alimentos y la vegetación, de allí parte el traslado de las garrapatas y la propagación de la piroplasmosis, de igual forma se debe tener en cuenta que la enfermedad se contagia a través del contacto con la sangre, agujas contaminadas y otros instrumentos que penetran la piel²⁵.

2.4.1. Principales vectores

Dentro de los principales vectores de la piroplasmosis encontramos las garrapatas, que son ectoparásitos hematófagos obligados de gran importancia médica y veterinaria, ya que producen daños a sus hospedadores por acción directa o por inoculación de organismos patógenos. Existen dos familias de garrapatas, la *Argasidae* (garrapatas blandas) las cuales no poseen escudo dorsal que incluyen los géneros *Argas*, *Otobius*, y *Ornithodoros* y las *Ixodidae* (garrapatas duras) las cuales poseen escudo dorsal que incluyen los generos *Amblyoma*, *Apanomma*, *Boophilus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Margaropus*, *Rhipicephalus*, *Rhipicetors spp*²⁷. La Piroplasmosis equina es transmitida por diferentes especies de garrapatas del género *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Hyalomma*. En el año 2005 Russell describe a las siguientes 12 especies de garrapatas como vectores de *Babesia caballi* y *Theileria equi* respectivamente.

Tabla 1. Principales especies de garrapatas trasmisoras según el parásito del cual son portadoras (28).

<i>Babesia equi</i>	<i>Babesia caballi</i>
<i>Rhipicephalus anguineous</i>	<i>Rhipicephalus anguineous</i>
<i>Rhipicephalus evertsi</i>	<i>Rhipicephalus bursa</i>
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	<i>Dermacentor nitens</i>
<i>Rhipicephalus bursa</i>	<i>Dermacentor salvarum</i>
<i>Dermacentor reticularis</i>	<i>Dermacentor marginatus</i>
<i>Dermacentor marginatus</i>	<i>Dermacentor reticularis</i>
<i>Hyalomma excavatum</i>	<i>Hyalomma excavatum</i>
<i>Hyalomma anatolicum</i>	<i>Hyalomma dromedarii</i>

La Asociación Americana de Medicina Veterinaria describió a *Dermacentor variabilis* como vector de ambos parásitos²⁸; algunas garrapatas del género *Boophilus* y a otros insectos hematófagos como vectores de estos parásitos²⁹.

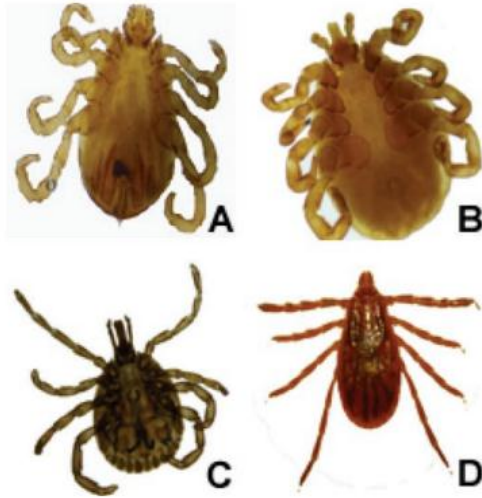


Figura 4. Garrapatas del género A. *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*; B. *Anocentor nitens* C. *Amblyomma cajenense*; y D. *Rhipicephalus sanguineus* (19).

2.4.2. Prácticas pecuarias

Las distintas prácticas pecuarias realizadas tanto por los profesionales en salud veterinaria como por los encargados del cuidado animal, pueden transmitir la piroplasmosis iatrogénicamente, a través de agujas o instrumental quirúrgico contaminado con sangre infectada³⁰. De igual forma se debe llevar a cabalidad las buenas prácticas pecuarias equinas, las cuales incluyen la administración de alimento inocuo, buenas prácticas de alimentación, cumplimiento de los requisitos sanitarios para las áreas en las que se encuentran los caballos, plan de saneamiento de las instalaciones, buen almacenamiento de insumos pecuarios y agrícolas, cumplimiento con todas las normas de bioseguridad por parte del personal debidamente capacitado para el manejo y cuidado del animal, control en la administración de medicamentos veterinarios y bienestar animal, evitando así la propagación de la enfermedad³¹.

2.5. TRATAMIENTO

El tratamiento para la piroplasmosis equina se basa principalmente en la administración de anti protozoarios para el control de hemoparásitos. Estos se dan a consideración del médico veterinario tratante del animal, quien deberá tener en cuenta el peso y el estado general del mismo para la dosificación del medicamento. Normalmente se combinan las dosis de cada medicamento. Se debe considerar que el parasito no es eliminado totalmente del animal siendo así portadores de la enfermedad de por vida. Tanto para *Babesia* como para *Theileria* se emplea el mismo tratamiento:

- ACETURATO DE DIMINACENO
- AMICARBALIDAS
- DIPROPIONATO DE IMIDOCARB

La administración de Fipronil (insecticida) tópico se realiza para la eliminación de las garrapatas y la Ivermectina como forma de prevención. Como terapia de sostén para la normalización del estado general del caballo se puede suministrar hierro, vitamina B12 y soluciones salinas o glucosadas. En el caso que el espécimen presente índices eritrocitarios menores a 12% y número de eritrocitos por debajo de los 2.5 millones se realiza transfusión sanguínea como alternativa terapeutica³².

2.6. PROFILAXIS

En el desarrollo de esta enfermedad se deben considerar los signos clínicos presentes en el espécimen, para poder realizar control de los mismos y disminuir los riesgos de la patología. Se ha descrito que tanto para el tratamiento como para la profilaxis es necesario efectuar control del vector como principal medida, de tal forma evitar su propagación de animal a animal.

En Colombia el control de las garrapatas se realiza con el uso intensivo de acaricidas sintéticos, se pueden encontrar en diferentes formas y concentraciones, como lo son baños, aspersores, e inyecciones; estos son suministrados en diferentes dosis dependiendo de las indicaciones del profesional encargado. Las garrapatas han generado resistencia a estos productos debido a la excesiva aplicación de

organofosforados y piretroides³³. Actualmente las garrapatas han generado resistencia a los acaricidas, de tal manera se hace necesaria la búsqueda de nuevas opciones para el control de garrapatas como agentes biológicos.

2.7. DIAGNÓSTICO

Actualmente en Colombia el diagnóstico de piroplasmosis se realiza según lo establecido por cada laboratorio, a pesar de ello la técnica más utilizada es la observación de FSP. No obstante, la entidad de referencia nacional del sector agropecuario ICA, hace la valoración de esta patología mediante ELISA competitiva. Además, existen más metodologías diagnósticas, tanto directas como indirectas, las cuales varían en sensibilidad y especificidad.

2.7.1. Métodos directos

El diagnóstico de la piroplasmosis equina se puede realizar mediante la identificación de los microorganismos en FSP mediante las colocaciones de Giemsa y Wright, o frotis de órganos; donde se observarán formas parasitarias. En la observación al microscopio *Babesia caballi* se ve unido en sus extremos posteriores, mientras que *Theileria equi* se observa agrupada en tétradas o en Cruz de Malta. Con frecuencia, se puede encontrar *Theileria equi* en sangre durante infecciones agudas, pero puede ser muy difícil de encontrar en los animales portadores asintomáticos⁶.

2.7.1.1. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Es una técnica de amplificación de secuencias específicas de ADN a partir de una secuencia blanco, la cual presenta gran eficacia debido a su alta sensibilidad, ya que detecta bajas parasitemias y una alta especificidad evitando los falsos positivos por reacciones cruzadas como ocurre en las pruebas serológicas, debido a esto es recomendada para identificar portadores crónicos. El tiempo de ejecución y los altos costos que requiere son dos inconvenientes de esta técnica, pero para la ejecución de la misma se puede utilizar diferentes muestras como lo son: sangre total, biopsia ganglionar o tejidos de garrapatas³⁴.

2.7.2. Indirectos

2.7.2.1. Fijación de complemento (CF)

La Fijación de complemento es una prueba exacta solo para la detección de infecciones tempranas, esta ofrece alta sensibilidad y especificidad, pero es posible que no identifique a todos los animales infectados, especialmente si han sido tratados farmacológicamente o si generan reacciones anti-complementarias. El antígeno para la fijación de complemento se prepara mediante la infección experimental de caballos, por tal motivo la CF se ha dejado de utilizar y ha sido sustituida por la inmunofluorescencia y la ELISA como pruebas más idóneas para el diagnóstico³⁵.

2.7.2.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Es una técnica aceptada por el Código Zoosanitario Internacional, por la cual se puede realizar la detección de portadores latentes y crónicos, identificación de especies y estudios seroepidemiológicos. Esta es más sensible y específica que el método de fijación de complemento. Esta metodología busca anticuerpos resultantes de la respuesta inmunológica a un patógeno. Estos son marcados con una sustancia fluorescente que permite su cuantificación³⁴.

2.7.2.3. Enzimoanálisis de competición (ELISAc)

La ELISA competitiva es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de interacción primaria, que determina la concentración de anticuerpos presentes en el suero del animal. Esta se basa en la competencia entre los anticuerpos presentes en la muestra y los anticuerpos marcados con una enzima presentes en el kit, por la unión con un antígeno adherido a la fase sólida del kit¹⁸.

2.8. EPIDEMIOLOGÍA

La organización mundial de sanidad animal (OIE) elaboró una lista única de las enfermedades de declaración obligatoria para animales tanto terrestres como acuáticos, cumpliendo con el acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la Organización Mundial del Comercio. De tal manera se tendrán en cuenta estas enfermedades como riesgos específicos, para poder brindar la atención requerida a todas las enfermedades que formen parte de dicha lista. Para el año 2018 se

encuentran descritas 117 enfermedades, entre ellas se encuentra la piroplasmosis equina³⁷.

La piroplasmosis está distribuida a nivel mundial, debido a que los vectores de esta patología se pueden encontrar en múltiples ecosistemas. Hay reportes en países de Europa tales como Portugal, España, Francia, Italia y la península balcánica, igualmente es endémica en Asia, África, Centro América y Sudamérica. Pero en algunos países como lo son Estados Unidos, Canadá, Japón y Australia se encuentran libres en parte o en su totalidad de la enfermedad³⁵.

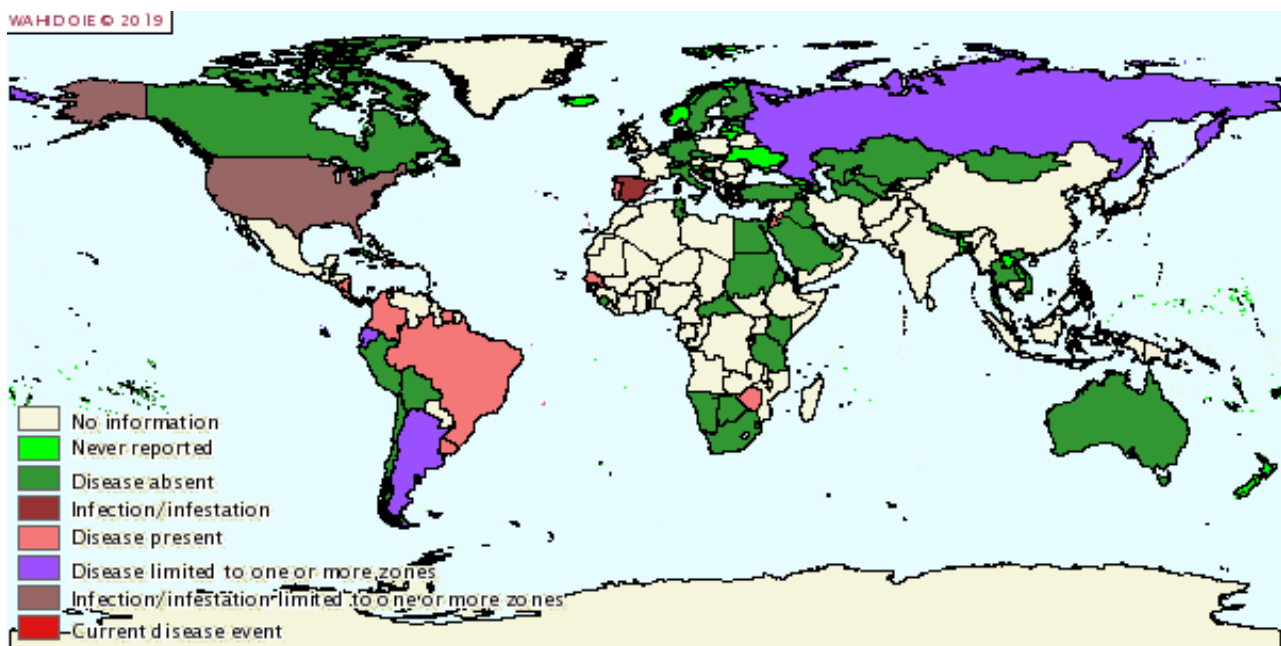


Figura 5. Distribución de Piroplasmosis a nivel mundial para el año 2018 (38).

Según los informes de la OIE en América se han encontrado varios focos de infección y reportes de la enfermedad clínica demostrada como Brasil, Costa Rica, Colombia, República dominicana y Nicaragua³⁹. Entre el 2017 y 2018 en Colombia el departamento de Cundinamarca presento 30 casos nuevos de piroplasmosis, siendo este el departamento con el mayor número de casos, seguido por Risaralda con 11 brotes nuevos, dándose mayor elevación en el mes de junio del 2018 con 10 casos nuevos en todo el país (Figura 6), dejando susceptibles a la mayoría de los equinos

presentes en las regiones con mayor frecuencia de piroplasmosis y confirmando la propagación de esta enfermedad⁴⁰.

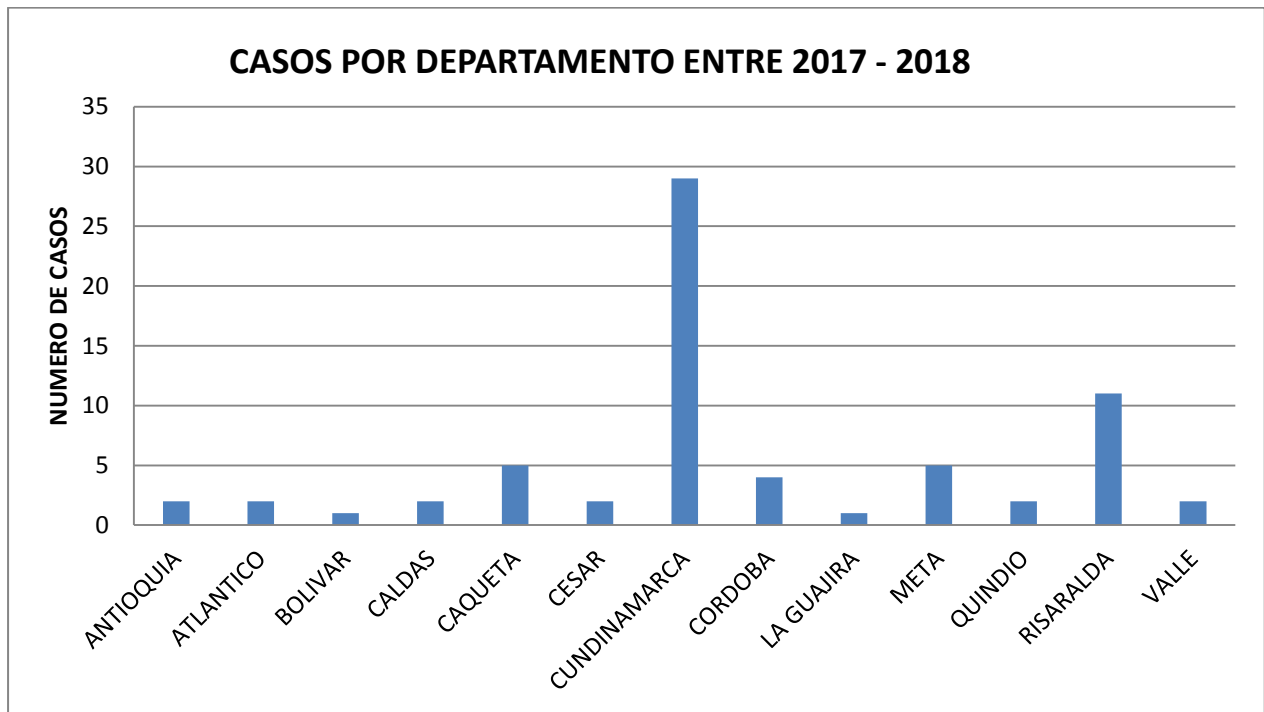


Figura 6. Número de casos reportados por departamento en Colombia entre los años 2017 y 2018. Reporte de la WAHIS, Datos de la salud animal mundial (40).

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. TIPO DE ESTUDIO

Descriptivo – Transversal.

3.2. UNIVERSO, POBLACIÓN, MUESTRA

3.2.1. Universo

Equinos y mulares del municipio de Quetame, Cundinamarca.

3.2.2. Población

La población determinada para este estudio fue equinos y mulares de las veredas Estaqueca, Chilcal bajo, Tibrote bajo y cabecera municipal de Quetame, Cundinamarca (Colombia).

3.2.3. Muestra

La estrategia que se utilizó para muestreo fue la creación de una jornada de sanidad veterinaria, en la cual se recolectaron 105 muestras de sangre en tubo sin aditivo y tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), estas de equinos y mulares. Se determina la toma de muestra según lo dispone la guía de toma de muestra y transporte de las mismas, según los parámetros indicados por el personal experto del Criadero Caballar Mancilla de la Policía Nacional.

3.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN

El personal de la alcaldía realizó la convocatoria para las jornadas de sanidad, donde se le informó a toda la población, sobre la toma de muestra y los fines de la misma. Se seleccionó a todos los especímenes que fueron llevados a la jornada de sanidad, para la participación en el presente estudio. Previa toma de muestra se le informó una segunda vez a los propietarios, el por qué y el para qué de la toma de muestra, además de la realización de una encuesta para la posterior tabulación y análisis de los resultados (Anexo 1). Estas se hicieron de forma oral, para el mayor

entendimiento de la comunidad y en caso de que el propietario no supiera leer o escribir.

3.4. VARIABLES

Para el análisis de los resultados de esta investigación, se realizó una encuesta donde se recolectaron los datos del propietario para la posterior entrega de resultados e información del equino o mular (Anexo 1). Obteniendo así la información para escoger las variables que se tuvieron en cuenta para la tabulación de resultados (tabla 2).

Tabla 2. Variables para el análisis de resultados (Autoras).

VARIABLE	
SEXO	Macho ♂
	Hembra ♀
ESPECIE	Equino (E)
	Mular (M)
PROCEDENCIA	Vereda a la cual pertenece

3.5. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

3.5.1. Metodología

Para el desarrollo de este estudio se realizó el contacto con la alcaldía del municipio de Quetame, en este caso con la Unidad Tecnológica Agropecuaria (UTA), entidad encargada del sector agropecuario. El Ing. Edwin Romero estudio la viabilidad del proyecto y solicito para llevarlo a cabo la certificación para la toma de muestra en equinos y mulares. Esto, con el fin de comprobar la pericia en la recolección de muestra en dichos animales, para prever posibles contingentes durante y después de la toma de muestra brindando seguridad al animal y al propietario. Se solicitó el apoyo al Criadero

Caballar Mancilla de la Policía Nacional para cumplir con este requisito además de la elaboración de una prueba piloto destinada a la observación de las variables a tener en cuenta en el proyecto y la estipulación de una guía para recolección, conservación y transporte de muestras de equinos y mulares, que permitiera generar una mayor calidad de la muestra, debido a contingentes observados con muestras anteriormente tomadas. El señor teniente Hamith Vargas dispuso a dos de los enfermeros del criadero para que hicieran la capacitación; una vez fue informado sobre la jornada él expuso su interés en la participación de la misma, brindando servicio de toma de muestra en equinos y mulares, atención medico veterinaria en dichos animales además de perros y gatos, exhibición de equinos y caninos pertenecientes a los Carabineros de la Policía Nacional (Figura 7).



Figura 7. Carabineros y equinos de Cundinamarca, Policía Nacional de Colombia (Autoras).

Se coordinó la jornada de sanidad entre la alcaldía, el criadero y la universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, la cual se realizó durante dos días, en 4 veredas del municipio las cuales fueron escogidas por recomendación del personal de la UTA debido a que en estas veredas había un importante número de mulares y equinos, además que se consideran centralizadas frente a otras veredas (Figura 8). En el muestreo se recolectaron 105 muestras, esta cantidad dependió de la acogida y conveniencia de cada propietario. Luego se analizaron estas muestras mediante la

realización de láminas de FSP, en las muestras encontradas positivas se hizo la búsqueda de anticuerpos tipo IgG contra *Theileria equi* y *Babesia caballi* mediante ELISA en los laboratorios del ICA, esto por motivos de ejecución del proyecto. Para la consecución de cada una de estas etapas se determinó un cronograma de actividades, para el buen desarrollo y orden del mismo (Figura 9).

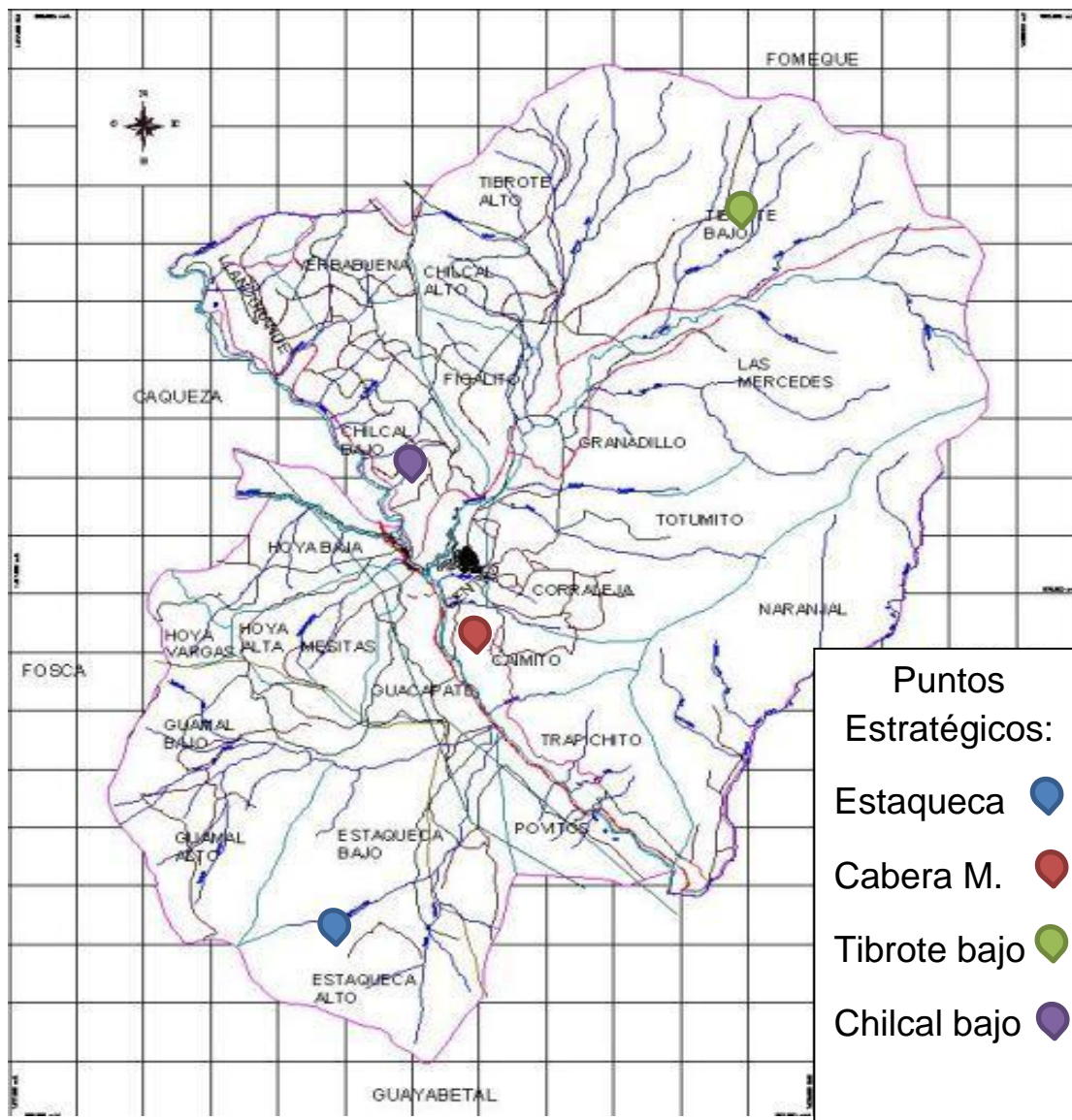


Figura 8. Mapa municipio de Quetame, Cundinamarca. Ubicación de veredas seleccionadas (41).

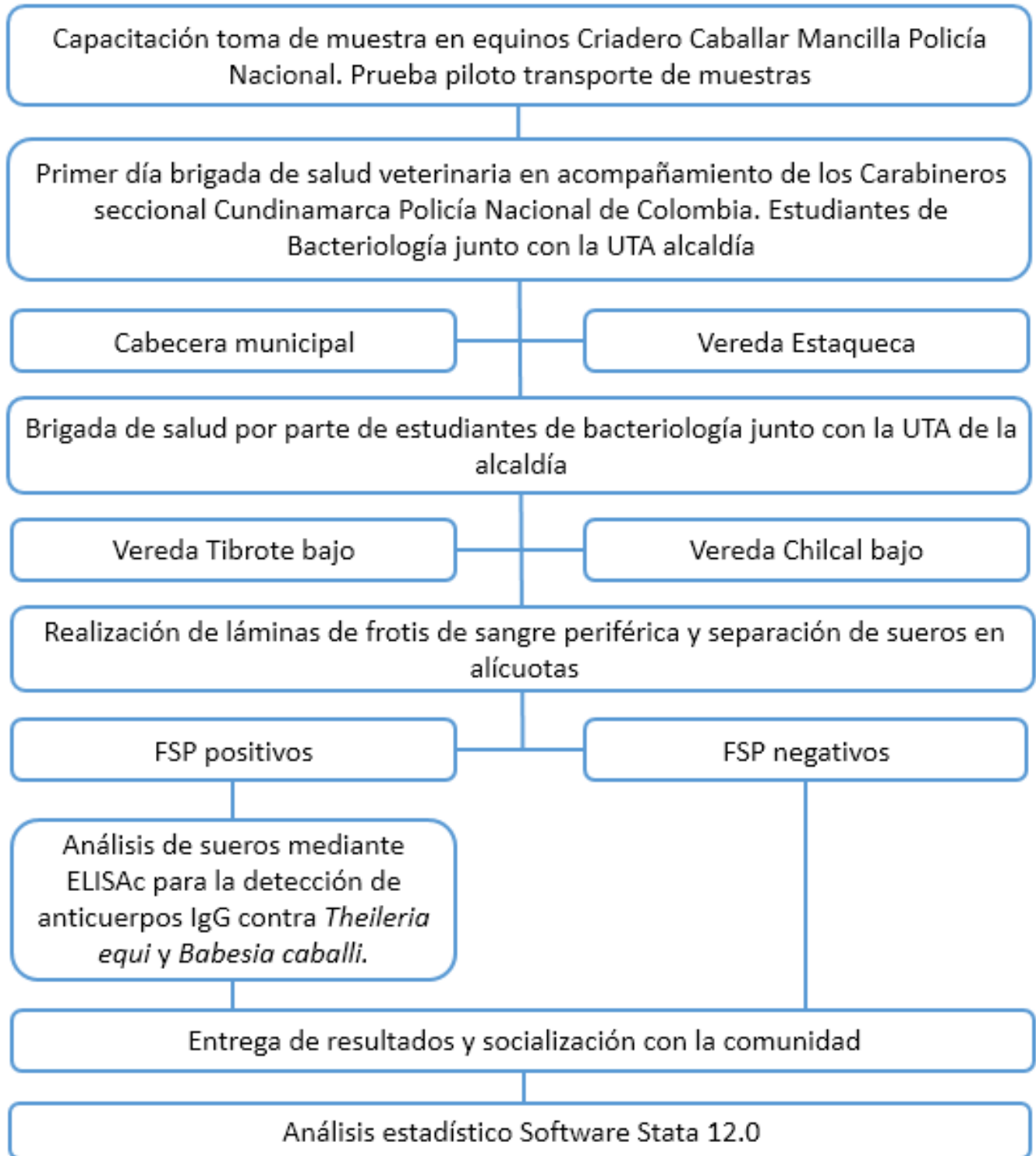


Figura 9. Diagrama de actividades (Autoras).

3.5.2. Capacitación y prueba piloto

Inicialmente se hizo la capacitación en toma de muestra en el Criadero Caballar Mancilla de la Policía Nacional los días 24 – 25 de enero del año 2018, mediante la guía de dos enfermeros equinos de esta institución, con el fin de tener las óptimas capacidades para la toma de muestra en equinos y mulares que fuesen incluidos en el presente estudio.

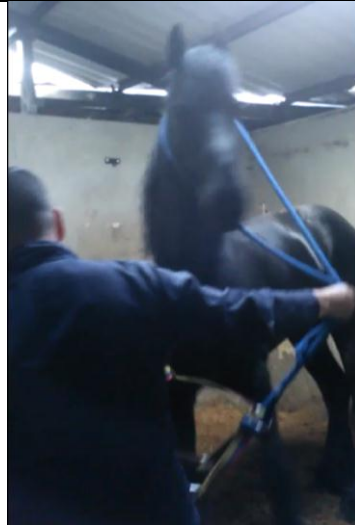


Figura 10. Criadero Caballar Mancilla – Policía Nacional de Colombia (Autoras).

A partir de esta experiencia, de la observación y explicación recibida por parte del personal encargado del Criadero Caballar Mancilla, se diseñó una guía para la recolección de muestra en equinos y mulares (Tabla 3); ello con el fin de estipular la manera por la cual se tomaron las muestras en las brigadas. Se debe aclarar, que cada paso se aplicó teniendo en cuenta el estado anímico del animal, el terreno donde se encontraba y la pericia de la persona que toma la muestra.

Tabla 3. Procedimiento para la recolección de muestra en equinos y mulares (Autoras).
Fotografías autoras.

1. Identificar al equino y colocarle la jáquima para poder sostenerlo.



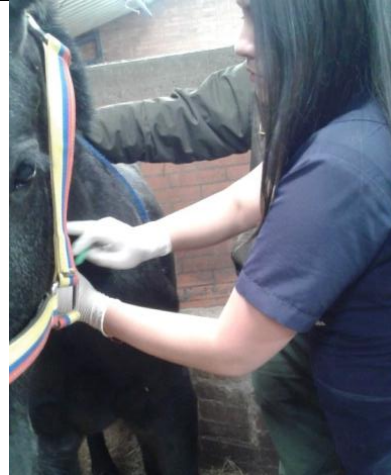
2. Colocarse los guantes y las medidas de bioseguridad



3. Rotular de manera adecuada los tubos



-
4. Identificar el sitio de la punción. Surco yugular entre músculo esternomandibular y el músculo braquiocefálico.



-
5. Limpiar el sitio con un algodón impregnado en alcohol, realizando un movimiento de arriba a abajo



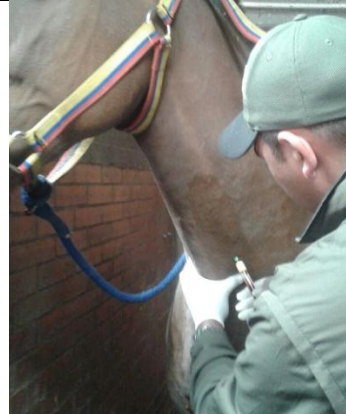
-
6. Realizar presión digital sobre el surco de manera que se llene la vena.



-
7. Introducir la aguja en un ángulo de 30° con el bisel hacia arriba



8. Poner el tubo
sosteniéndolo hasta que
este se llene



9. Retirar el tubo y mezclarlo
las veces que sea
necesario



10. Retirar la aguja y limpiar el
sitio de punción



11. Transportar la muestra para su procesamiento.

Paralelamente, se llevó a cabo una prueba piloto en la que se recolectaron 55 muestras para la evaluación de los contingentes que se pudiesen presentar en la recolección, transporte y procesamiento de las mismas. Donde se evaluó la temperatura óptima de transporte, diferentes métodos de embalaje y las posibles variables a tener en cuenta para la tabulación de los datos.

En dicha prueba se recolectaron muestras de sangre en tubos con EDTA y sin aditivo. Se determinó que los tubos sin aditivo se deben centrifugar lo más pronto posible; dado el caso no se cuenta con una centrifuga se debe disponer el tubo en posición vertical, durante una hora para permitir la contracción del coagulo sanguíneo y de esta manera obtener el suero. Los tubos tapa lila se deben mezclar de 4 a 6 veces, de manera suave, para no llegar a causar hemolisis de los eritrocitos. De ser necesario realizar FSP, este se deberá hacer inmediatamente después se recolecte la sangre, debido a que el paso del tiempo hace que la muestra se degrade y pierda su estado normal. En el transporte de muestras se evidencio que la temperatura ideal oscila de 2 a 4°C, esto en el caso de tener que transportarlas largos periodos de tiempo. Se recomienda su procesamiento lo más pronto posible luego de la recolección.

Se tomaron 55 muestras de distintos equinos siguiendo el anterior protocolo y las instrucciones de los funcionarios del criadero, sin tener en cuenta variables como sexo, trabajo, edad, ni lugar donde se encuentra el animal. Del total de las muestras 51 se hemolizaron, por lo tanto, se descartaron inmediatamente. En cuanto a las 4 muestras restantes se centrifugaron 3 para la obtención de suero, pero no se analizaron ya que no eran una población representativa, y con la muestra restante se hizo un frotis de sangre periférico encontrando todos los parámetros sanguíneos normales (Figura 11).

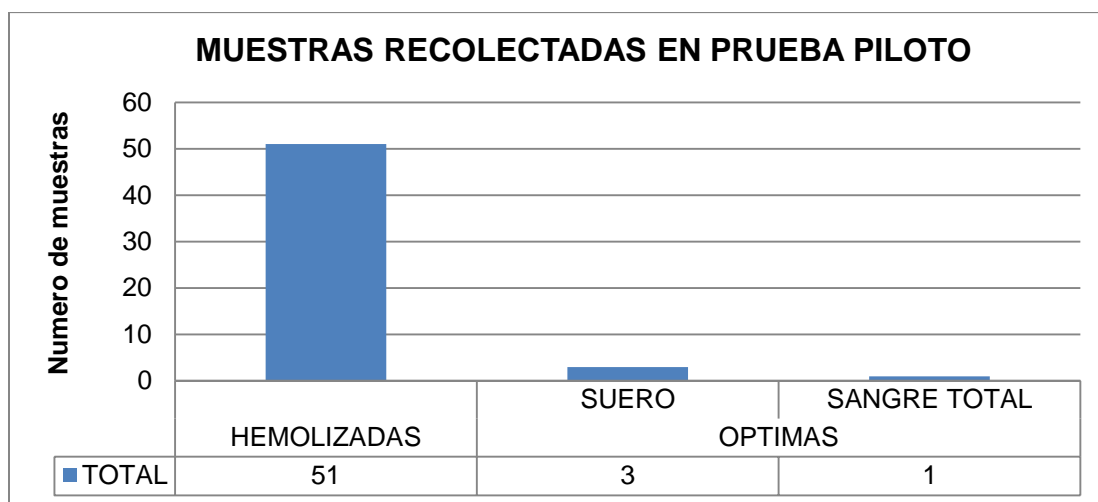


Figura 11. Resultados prueba piloto en el Criadero Caballar Mancilla (Autoras).

3.5.3. Jornada de sanidad veterinaria

Durante el desarrollo de la jornada de sanidad veterinaria se recolecto 105 muestras para llevar a cabo la presente investigación. Se seleccionaron 4 veredas para la realización de la jornada por recomendación del personal idóneo de la UTA, ya que estas tenían mayor población de equinos y mulares además de localización centralizada; esta se realizó los días 9 – 10 de abril del 2018. Contando con el acompañamiento del personal médico del Criadero Caballar Mancilla y el grupo de carabineros y guías caninos de Cundinamarca de la Policía Nacional, los estudiantes de octavo semestre de Bacteriología y Laboratorio clínico énfasis en diagnóstico veterinario de la universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y el personal de la UTA de la alcaldía. Se brindó el servicio de desparasitación, vacunación, toma de muestra y atención médica a perros y gatos, adicionalmente desparasitación, toma de muestra y atención médica a mulares y equinos. El primer día de la brigada se desarrolló en la cabecera municipal en horas de la mañana (Figura 12 - 16).



Figura 12. Jornada sanidad apoyo UCMC, carabineros de la Policía y Uta de la alcaldía (42).



Figura 13. Desparasitación de equino (Autoras)



Figura 14. Toma de muestra de sangre en tubo tapa roja (Autoras).



Figura 15. Toma de muestra y posterior consulta médica médicos veterinarios Criadero Caballar Mancilla (Autores).



Figura 16. Dificultad en toma de muestra. Apoyo entre personal idóneo para el manejo del animal (Autoras).

Además, en la cabecera municipal, se hizo la exhibición de los equinos y caninos antinarcóticos pertenecientes al grupo de carabineros y servicio de herraje por parte los carabineros de Cundinamarca de la Policía Nacional (Figura 17).



Figura 17. Servicio portátil de herraje de la Policía (Autoras).

En las horas de la tarde se desarrolló la jornada en la vereda Estaqueca (Figura 18-19).



Figura 18. Acogida a la jornada de sanidad veterinaria vereda Estaqueca (Autoras).



Figura 19. Toma de muestra de sangre a mular de la vereda Estaqueca (Autoras).

Una vez tomada la muestra y realizada la desparasitación, en caso de que el propietario lo solicitara el médico veterinario realizaría la revisión al animal para luego entregar las correspondientes indicaciones médicas (Figura 20 - 21).



Figura 20. Entrega recomendaciones médicas del médico veterinario (Autoras).



Figura 21. Consulta médico veterinario Criadero Caballar Mancilla (Autoras).

El segundo día se desarrolló la jornada en las veredas de Tibrote bajo y Chilcal bajo, contando con los estudiantes y el personal de la UTA de la alcaldía. Se brindó el

servicio de desparasitación, vacunación y atención médica a perros y gatos, además la desparasitación y toma de muestra a mulares y equinos.

En las horas de la mañana se llevó la jornada a la vereda de Tibrote bajo (Figura 22 - 23).



Figura 22. Desparasitación de equino (Autoras).



Figura 23. Punción Yugular para toma de muestra a mular con apoyo de la comunidad de Tibrote bajo (Autoras).

En las horas de la tarde se desarrolló la jornada en la vereda Chilcal bajo (Figura 24).



Figura 24. Toma de muestra en equino de la vereda Chilcal bajo (Autoras).

En algunos casos estipulados por el médico veterinario se hizo punción facial (Figura 25).



Figura 25. Inspección dental previa punción facial (Autoras).

En todos los casos se recolecto las muestras en un tubo tapa lila y en un tubo tapa roja, para la obtención de sangre total y suero respectivamente (Figura 26). Al momento de tomar la muestra se hizo la encuesta para la recolección de información específica del animal y de su propietario, para ser empleada en el análisis de los resultados (Figura 27).

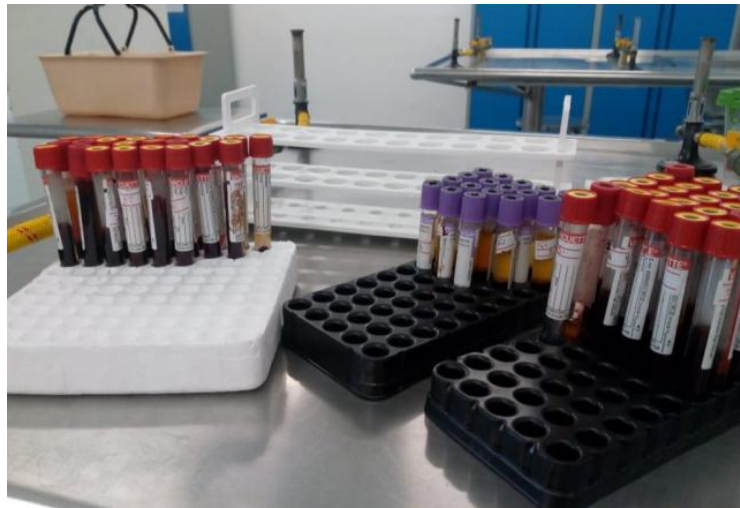


Figura 26. Muestras recolectadas en tubos tapa lila y tapa amarilla (Autoras).



Figura 27. Recepción de datos para diligenciar la encuesta a cada propietario (Autoras).

3.5.4. Adecuación de la muestra

Teniendo en cuenta los resultados de la prueba piloto, una vez se tomaron las muestras tanto de tubo con EDTA y sin aditivo se adecuaron para su análisis. En primer lugar, la sangre total recolectada en los tubos con EDTA inmediatamente después de la recolección de la muestra fue empleada para la realización de los FSP para cada uno de los animales participantes del estudio, luego se guardaron para su posterior coloración. En cuanto a los tubos sin aditivo, el primer día de la jornada fueron centrifugados ya que se contaba con la centrifuga proporcionada por el laboratorio clínico del Criadero Caballar Mancilla y el segundo día después de tomar la muestra se mantuvo en reposo y en posición vertical para que se separará el suero del componente celular por sedimentación. Separados los sueros, se dispusieron en alícuotas rotuladas con el número designado para cada animal en la base de datos diseñada para el estudio, se dispusieron en orden numérico ascendente y se guardaron en nevera a una temperatura de -20°C para su posterior procesamiento (Figura 28).



Figura 28. Separación de sueros de las muestras en tubos Eppendorf (Autoras).

3.5.5. Frotis de sangre periférica

El Frotis de Sangre Periférica o FSP es la prueba reina o Gold estándar para el diagnóstico de piroplasmosis, permitiendo observar formas parasitarias dentro de los

eritrocitos. En cada uno de los FSP realizados para el estudio, se analizaron las células sanguíneas como lo son los hematíes, leucocitos y plaquetas, además de la búsqueda de hemoparásitos. Para la elaboración del FSP se cumplieron dos etapas, las cuales son la realización de la lámina y la coloración. Se debe tener mucho cuidado ya que de esto depende el adecuado diagnóstico, debido a que factores como la débil coloración o mala elaboración de lámina impedirán la observación de dichos protozoos.

3.5.5.1. Realización de lámina

Para la realización de las láminas se siguieron los siguientes pasos (Figura 29):

1. Colocar una gota de sangre en la lámina
2. Colocar lámina extensora sobre la gota de sangre
3. Realizar un movimiento hacia atrás para extender la gota por capilaridad
4. De manera rápida y sin pausa mover la lámina extensora hacia adelante
5. Terminar el extendido hasta que se forme una punta redondeada
6. Extendido listo para su posterior coloración

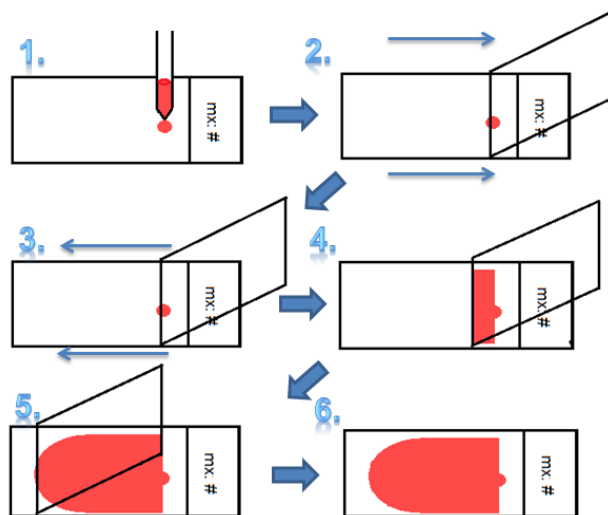


Figura 29. Pasos para la elaboración de la lámina para FSP (Autoras).

3.5.5.2. Coloración

Una vez realizadas las láminas se hizo la tinción de cada una de ellas mediante la coloración de Wright. Esta es una tinción tipo Romanowsky modificado se basa en las cargas catiónicas y aniónicas que posee las células generando así coloración. Esta coloración se hace ubicando las láminas sobre una base nivelada, luego se coloca el

colorante Wright de modo que cubra totalmente el extendido dejándolo durante 3 minutos, luego se aplica el buffer igualmente cubriendo la totalidad del extendido por otros 3 minutos hasta que se produzca brillo metálico, transcurrido el tiempo se lava muy bien la lámina quitando el excedente de colorante y se deja secar para poder observar al microscopio (Figura 31).

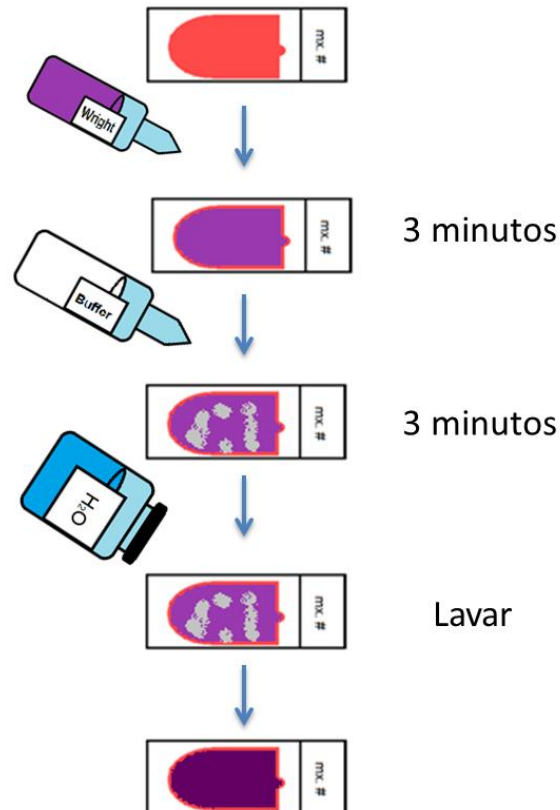


Figura 30. Esquema para la coloración de la lámina mediante tinción de Wright (Autoras).

3.5.5.3. Observación

Los FSP se analizaron en dos etapas, la primera para su procesamiento rutinario como lo es la observación de número, forma y aspecto de las células y luego para búsqueda más exacta de parásitos intraeritrocitarios.

3.5.6. ELISA

Identificadas las muestras positivas mediante la observación del FSP, se seleccionaron sus respectivos sueros para ser procesados en los laboratorios del ICA. Se analizaron un total de 11 sueros mediante la técnica de ELISA competitiva para la

búsqueda de anticuerpos tipo IgG contra *Theileria equi* y *Babesia caballi*. Esta técnica se basa en la unión antígeno – anticuerpo, en este caso en antígeno de cada parásito esta adherido a los posos. Los anticuerpos tanto del suero de cada muestra como del sustrato competirán para unirse con el antígeno de la muestra de tal manera que es inversamente proporcional, lo que se refiere a que entre más color menor concentración de anticuerpos y en menor color mayor concentración de anticuerpos (Figura 31).

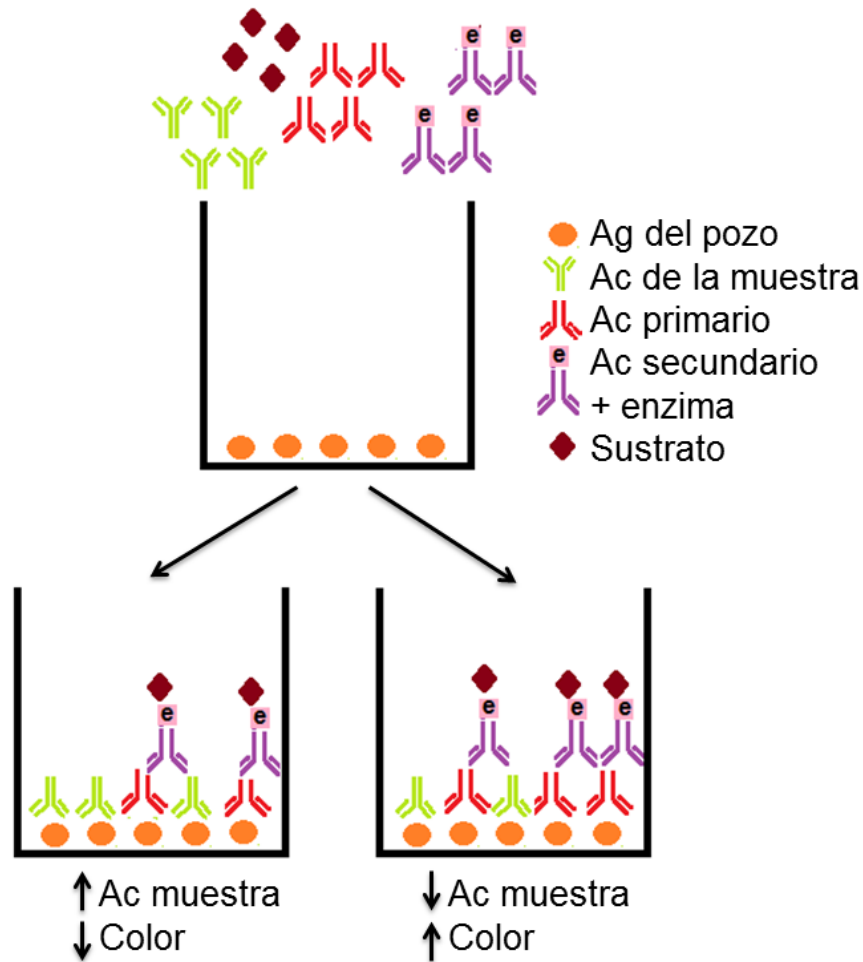


Figura 31. Esquema del fundamento de la técnica ELISA de tipo competitivo (Autoras).

Para cada una de las 11 muestras se realizó la detección de anticuerpos IgG para los dos parásitos; cada uno con su kit específico pero los dos de la misma casa comercial indicando el mismo procedimiento para cada uno. Se explica el procedimiento para el análisis de las muestras según la guía utilizada por el ICA en la Tabla 4 (Anexo 2).

Tabla 4. Procedimiento para la realización de ELISA competitiva para la detección de anticuerpos tipo IgG (Autoras). Fotografías de autoras.

ELISA COMPETITIVA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS KIT COMERCIAL

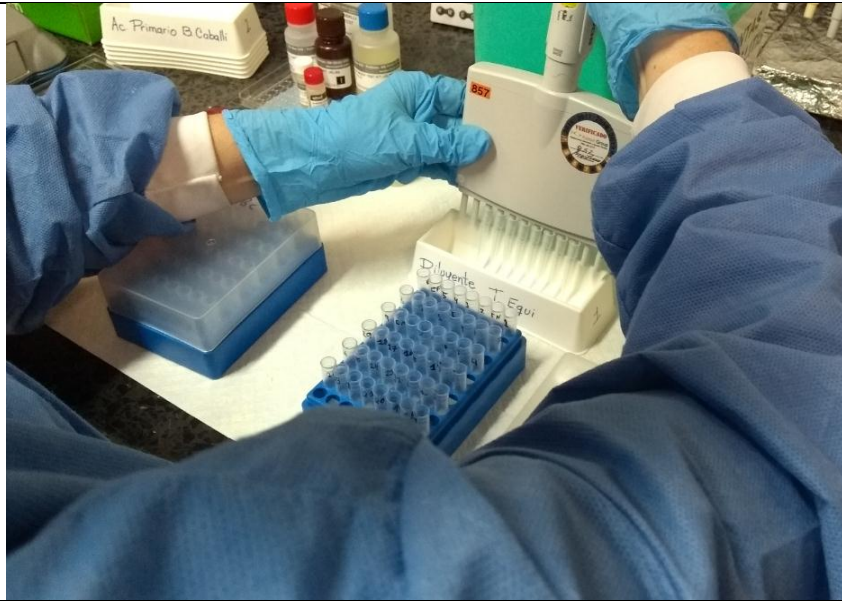
Comprobación de formato de procedimiento para la realización de ELISA

Preparación de solución de lavado

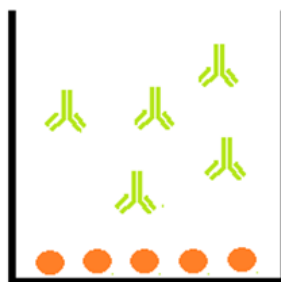
Asignar la distribución para las muestras (Mx), control positivo (CP) y control negativo (CN). Cada muestra se procesa por duplicado para mayor calidad.



Realizar dilución 1:2
de los sueros Mx,
CP y CN
40µl diluyente
**(Serum Diluting
Buffer)**
+
40 µl Mx, CP y CN



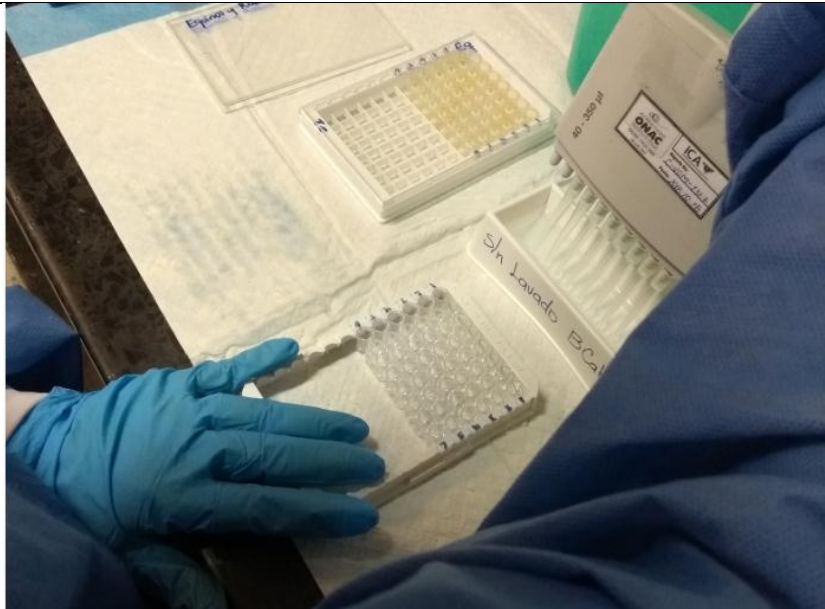
**Adicionar 50 µl Mx,
CP y CN a cada
pozo**



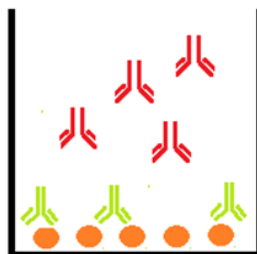
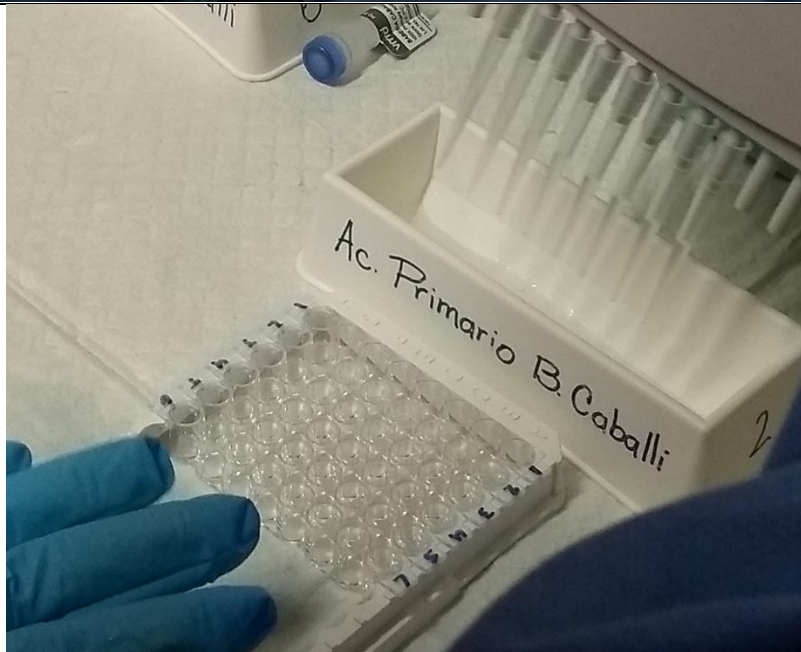
● Ag del pozo
Y Ac de Mx, CP y CN

Incubar a temperatura ambiente (23+/- 2°) durante 30 minutos

Lavar la placa 4 veces con 300 μ l de solución de lavado por pozo



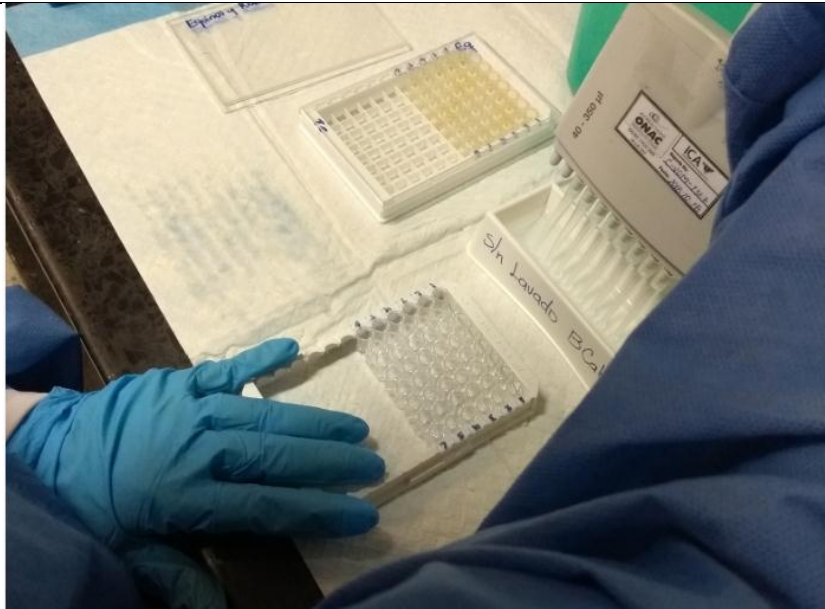
Adicionar 50 μ l de anticuerpo primario, CP y CN a cada pozo. Este en una dilución 1X:
30 μ l de reactivo
+
3 ml de diluyente



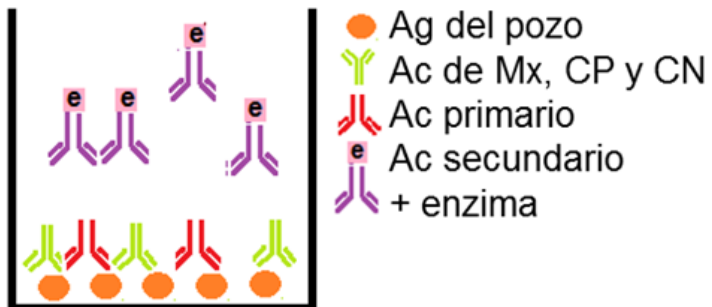
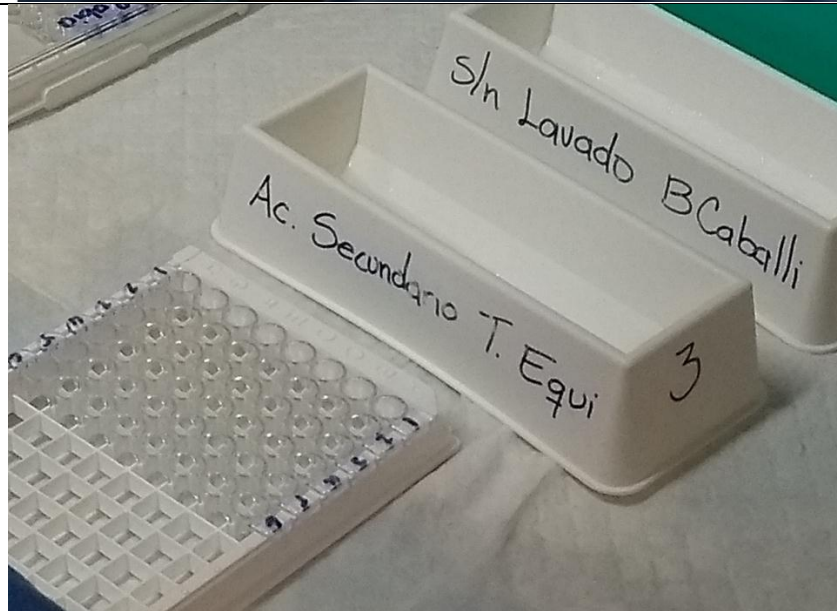
● Ag del pozo
Y Ac de Mx, CP y CN
Y Ac primario

Incubar a temperatura ambiente (23 \pm 2 $^{\circ}$) durante 30 minutos

Lavar la placa 4 veces con 300 µl de solución de lavado por pozo

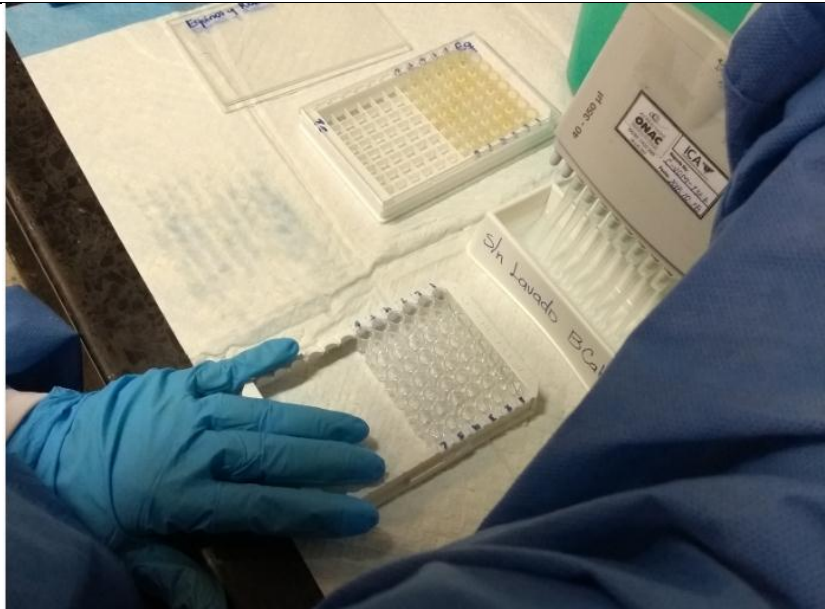


Adicionar 50 µl de anticuerpo secundario, CP y CN a cada pozo. Este en una dilución 1X: 30 µl de reactivo (Secondary Antibody Peroxidase Conjugate) + 3 ml de diluyente (Antibody Diluting Buffer)

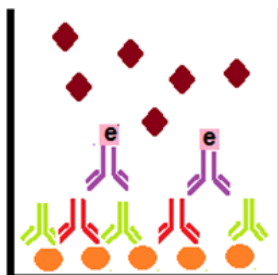
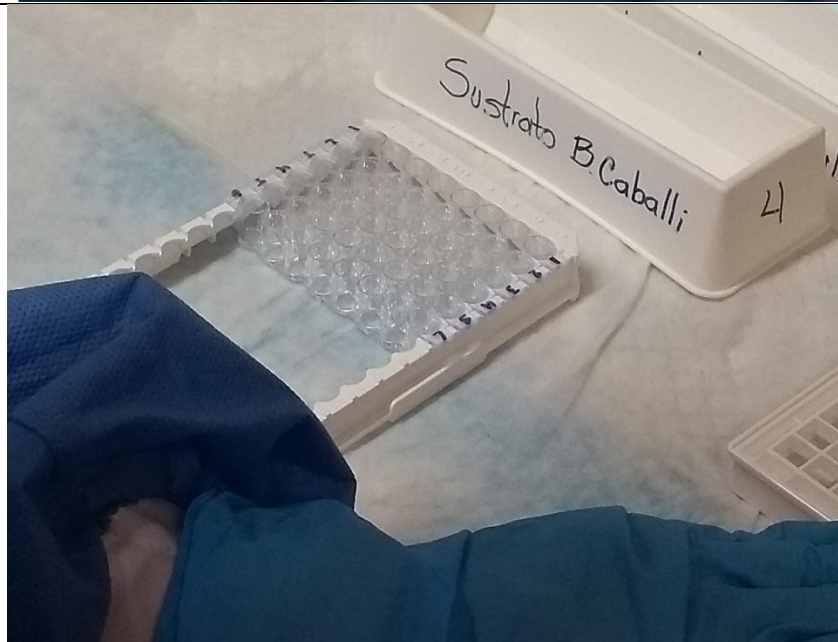


Incubar a temperatura ambiente (23+/- 2°) durante 30 minutos

Lavar la placa 4 veces con 300 µl de solución de lavado por pozo



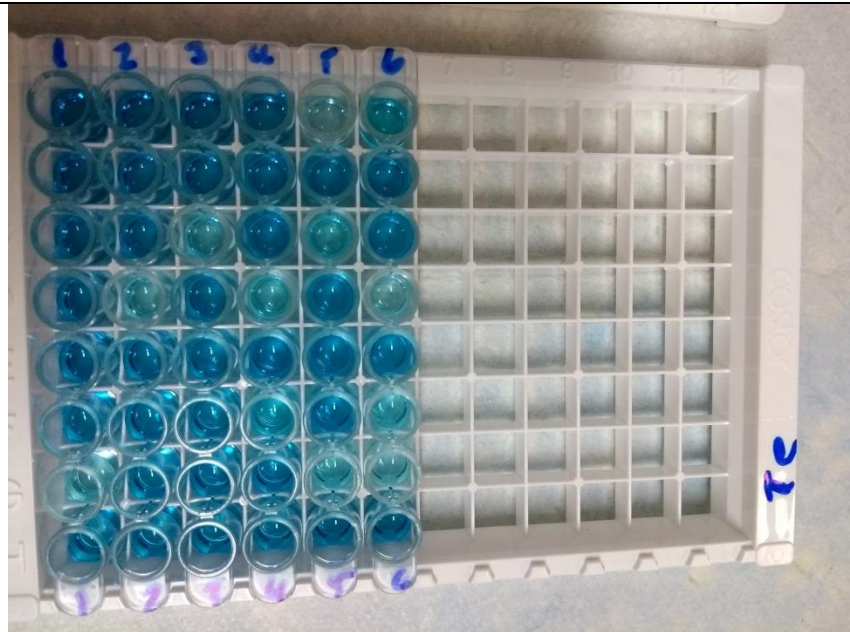
Adicionar 50 µl de sustrato, CP y CN a cada pozo.



- Ag del pozo
- Y Ac de Mx, CP y CN
- Y Ac primario
- e Ac secundario + enzima
- ◆ Sustrato

Incubar a temperatura ambiente (23+/- 2°) durante 30 minutos

Adicionar 50 μ l de solución de bloqueo, CP y CN a cada pozo.



Realizar la lectura de los pozos en espectrofotómetro



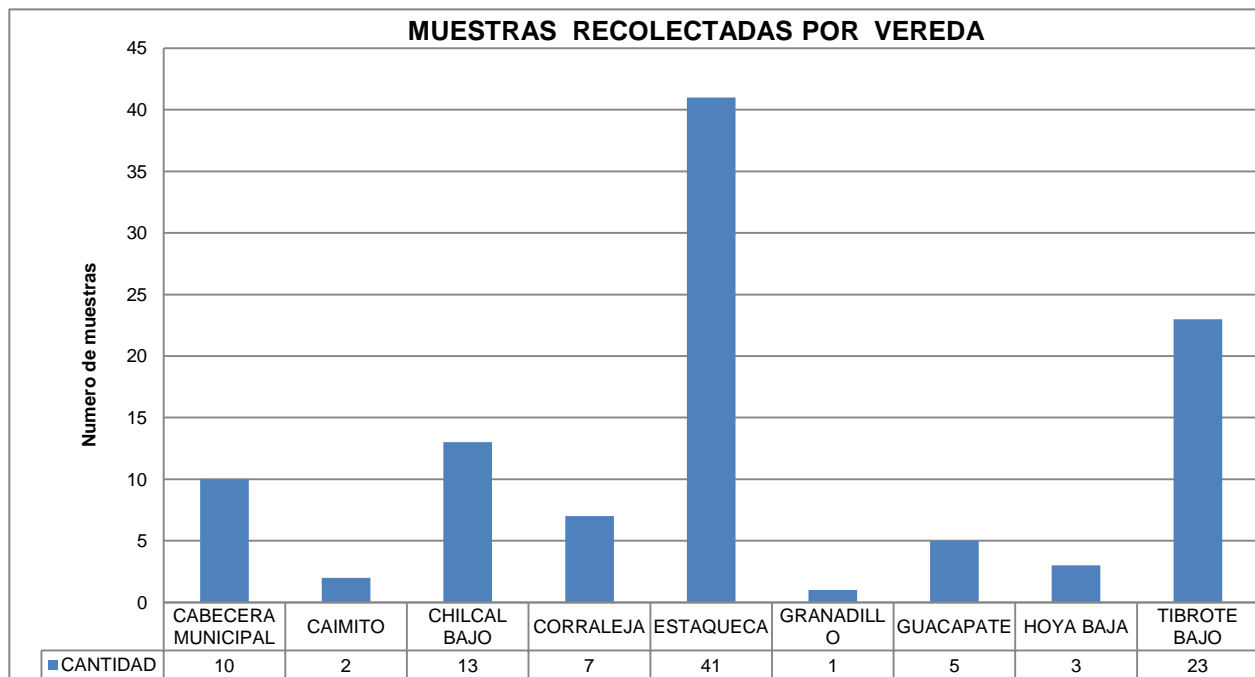
3.5.7. Análisis estadístico

Se hizo un compendio de los datos recolectados en la encuesta en programa de Excel, se determinó si había diferencias significativas de las variables independientes, sexo y especie frente a la presencia de *Babesia caballi*, *Theileria equi* y confección mediante la prueba estadística Chi-cuadrado (Software Stata 12.0), el test se analizó con un índice de confianza del 95%, donde el valor de $p < 0.05$ representa diferencia significativa.

4. RESULTADOS

4.1. MUESTRAS

Se recolectaron un total de 105 muestras de las cuales 5 se hemolizaron, obteniendo así 100 muestras aptas para la realización de los análisis. Aunque, se hicieron las jornadas en 4 veredas, propietarios de otras veredas movilizaron sus animales para participar de la misma; resultando así, que los animales procedían de 9 de las 25 veredas del municipio representando de esta manera el 36% del total de las veredas (Figura 32). Se tuvo en cuenta la vereda de procedencia para la correlación de las muestras positivas con el piso térmico en el cual habita normalmente el animal, de tal manera la vereda con mayor población fue la de Estaqueca con 41, seguido por Tibrote bajo 23, Chilcal bajo 13 y en menor cantidad fue Granadillo con 1, adicionalmente, aunque la cabecera municipal es el centro de encuentro del Municipio solo se obtuvieron 10 muestras (Gráfica 1).



Gráfica 1. Numero de muestras recolectadas pertenecientes a las distintas veredas del municipio (Autoras).

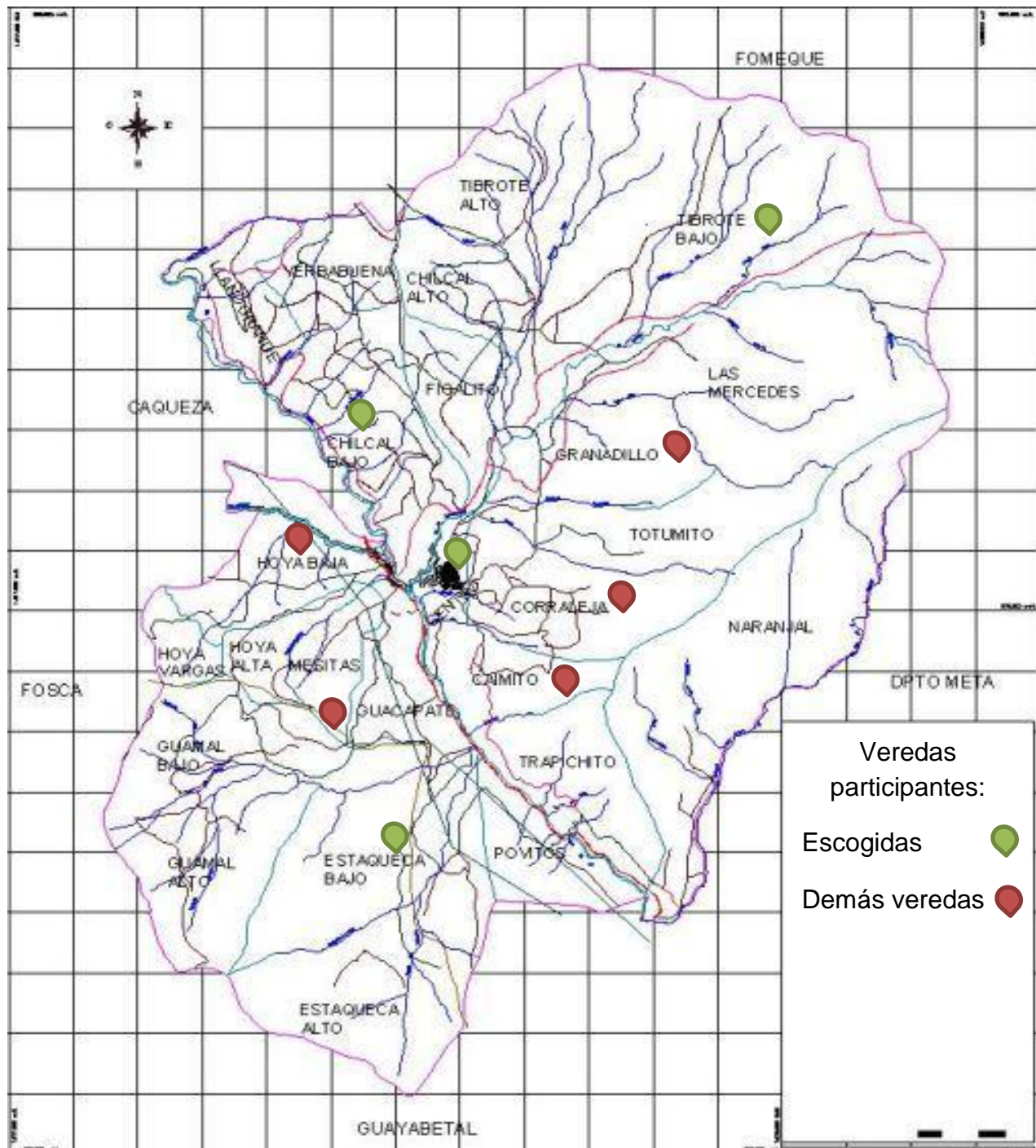


Figura 32. Mapa municipio de Quetame, Cundinamarca. Ubicación de veredas seleccionadas (41)

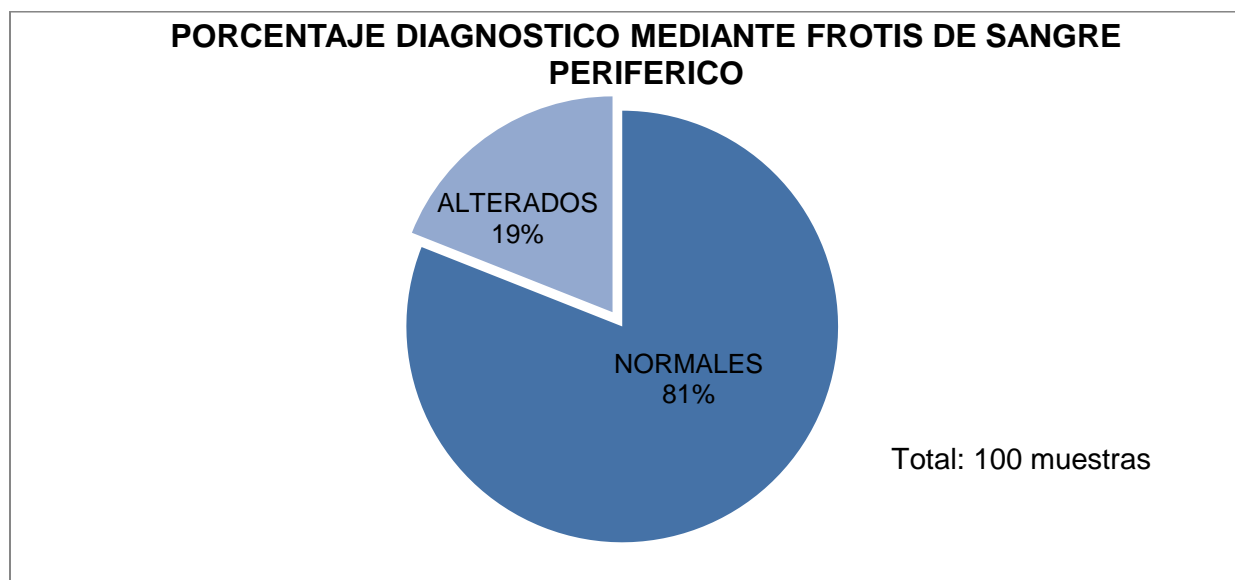
De los 100 especímenes cuyas muestras fueron aptas para el estudio, el 68% (68/100) eran machos y el 32% (32/100) hembras. Por especie el 78% (78/100) eran equinos y el 22% (22/100) restante eran mulares (Tabla 5).

Tabla 5. Características de la población según sexo y especie (Autoras).

VARIABLE	FRECUENCIA	%
SEXO		
MACHO ♀	68	68%
HEMBRA ♂	32	32%
ESPECIE		
EQUINO (E)	78	78%
MULAR (M)	22	22%

4.2. FROTIS DE SANGRE PERIFÉRICO

En el análisis de los 100 FSP se encontró que 81% (81/100) especímenes estaban sanos, ya que no se exhibían ningún tipo de alteración en la forma, tamaño o número de células, ni presencia de parásitos y 19% (19/100) presentaban algún tipo de alteración ya sea en cuanto a las células sanguíneas o por la presencia de algún tipo de parásito (Grafica 2).



Gráfica 2. Porcentaje de diagnósticos obtenidos de la observación de FSP (Autoras).

De los 19 FSP alterados, se encontró que 6 tenían algún tipo de anomalía en sus leucocitos como lo es un porcentaje mayor de lo normal de linfocitos o eosinófilos, entre otros, 1 ejemplar en el cual a la observación del FSP se evidencia formas parasitarias compatibles con tripanosoma el cual es causante de la denominada surra equina (Figura 33-34), 1 ejemplar con acantocitosis, además de linfocitos reactivos y restos celulares; el cual posteriormente en una jornada sanitaria del ICA fue diagnosticado con anemia infecciosa y fue sacrificado. Adicionalmente, 11 ejemplares con piroplasmosis (Grafica 3).

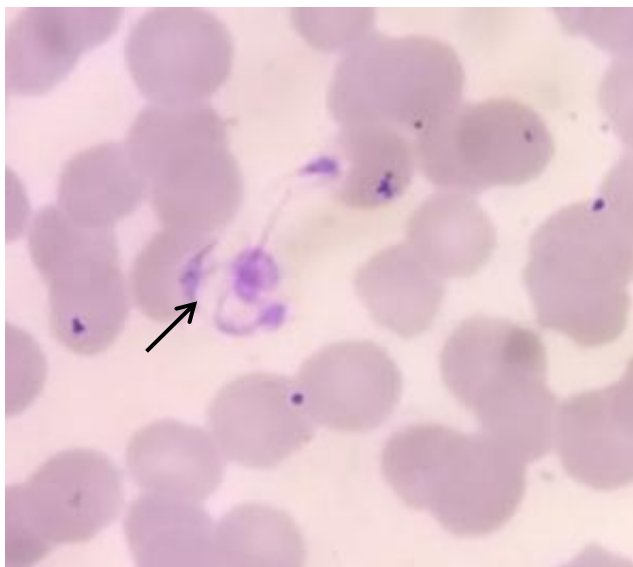


Figura 33. Fotografía de formas compatibles con tripanosomas encontradas en FPS (Autoras).

100X

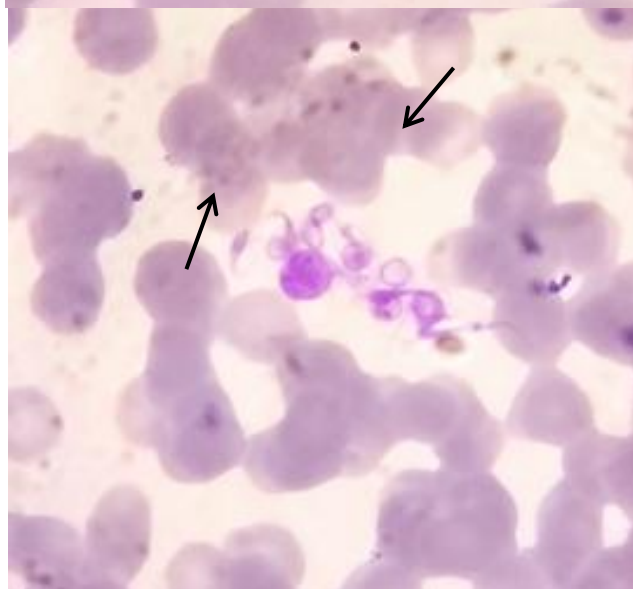
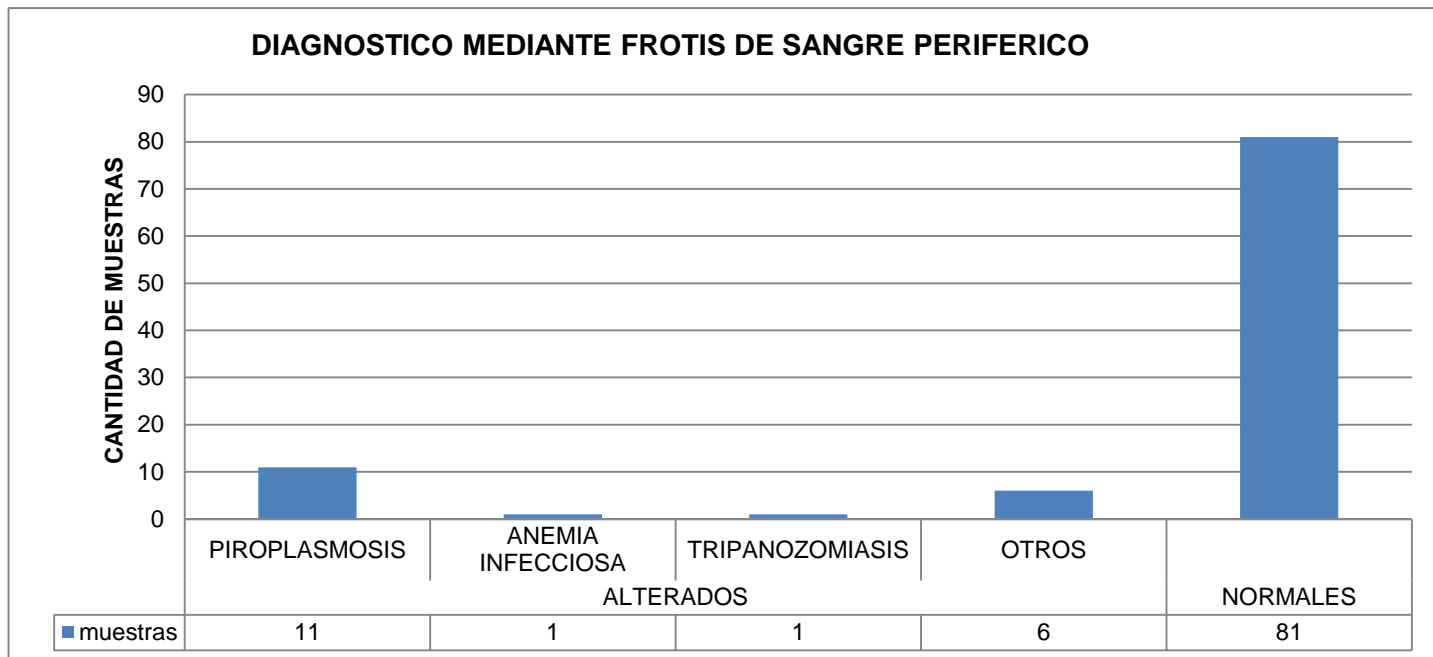


Figura 34. Fotografía de formas compatibles con tripanosomas encontradas en FPS (Autoras).

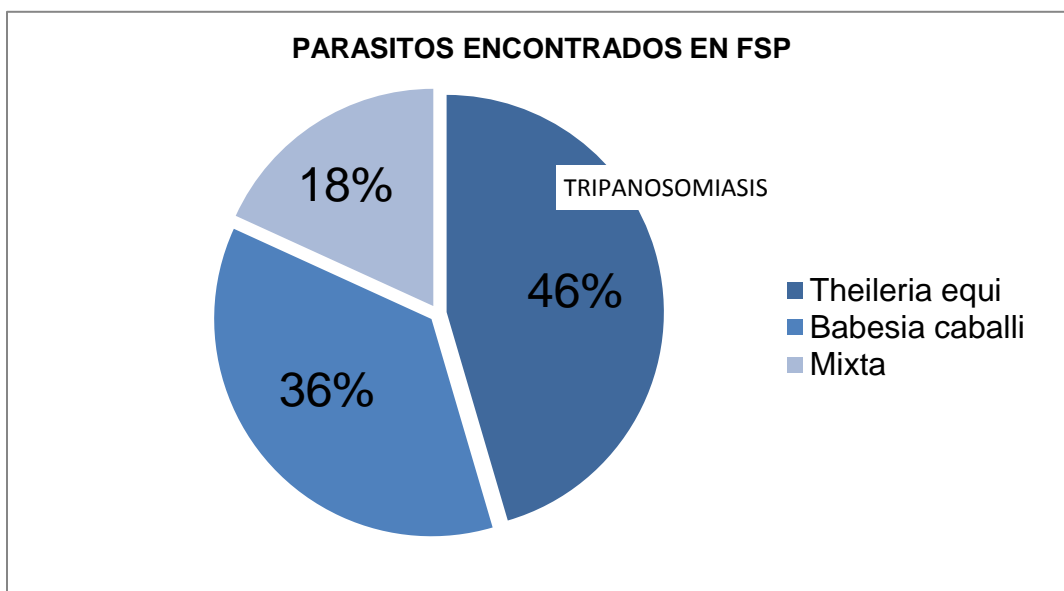
100X



De las 11 muestras encontradas positivas para piroplasmosis 5 eran por *Theileria equi* representado el 46%, 4 por *Babesia caballi* siendo el 36% y 2 con infección mixta o

Gráfica 4. Alteraciones evidenciadas en los FSP analizados (Autoras).
 coinfección en la que se encontraron tanto *Theileria equi* como *Babesia caballi* siendo 18% (Gráfica 4) (Figuras 35-37).

Gráfica 3. Porcentaje de parásitos causantes de piroplasmosis encontrados en los FSP (Autoras).



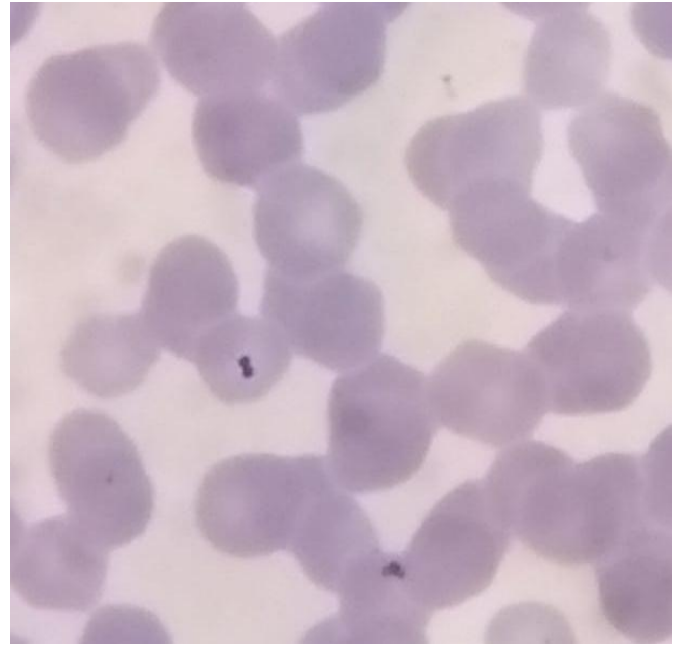
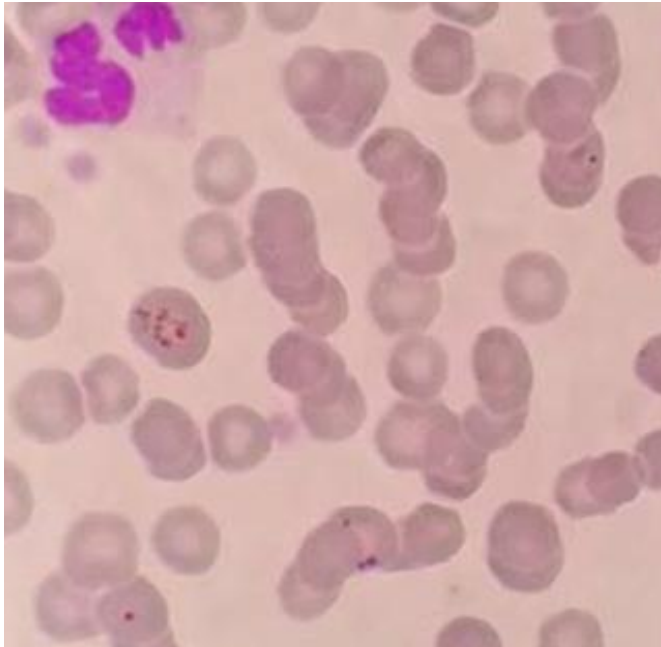


Figura 35. Fotografía de merozoitos de *Babesia caballi* dentro de hematíes en frotis de sangre periférico en muestras del estudio (Autoras).

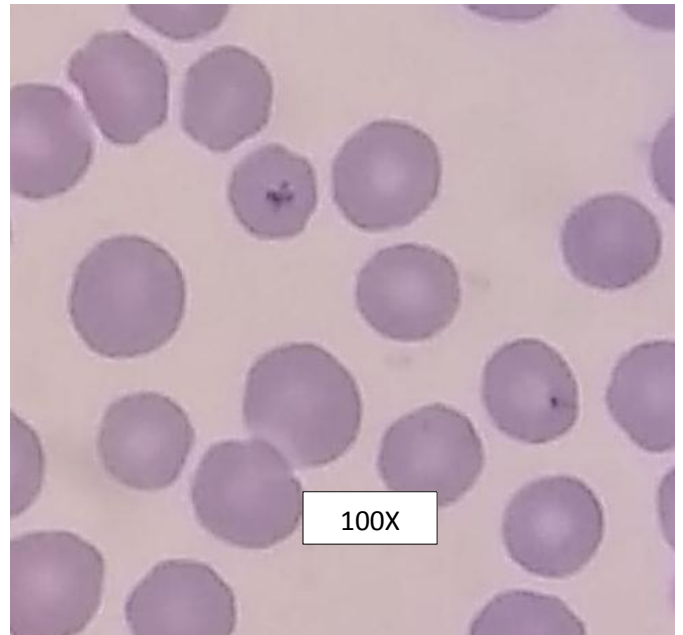
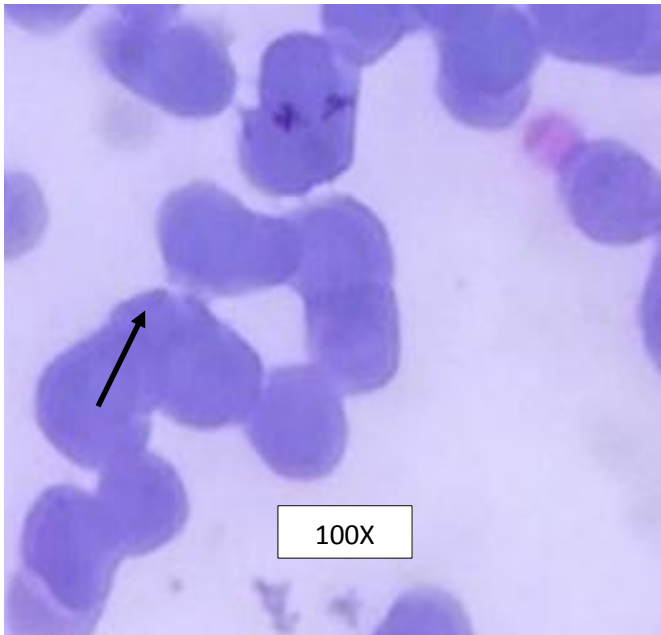


Figura 36. Fotografía de merozoitos de *Theileria equi* dispuestos en cruz de malta dentro de hematíes en frotis de sangre periférico en muestras del estudio (Autoras).



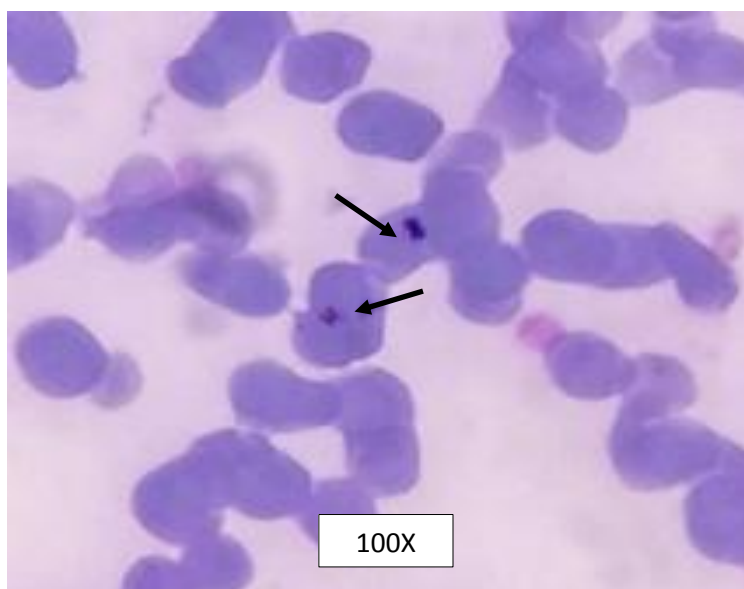


Figura 37. Fotografía de coinfección observada en frotis de sangre periférico (Autoras).

4.3. VARIABLES

A partir de la información suministrada en la encuesta por los propietarios se seleccionaron las variables más relevantes como lo fue el sexo, la especie y el lugar de procedencia. Teniendo en cuenta la variable sexo no se evidenció diferencias significativas ($p > 0.05$) en la frecuencia de *Theileria equi* (♂4/100 y ♀1/100), *Babesia caballi* (♂2/100 y ♀2/100) y coinfección (♂1/100 y ♀1/100). No se encontró diferencia de la variable especie ($p > 0.05$) respecto a la frecuencia de *Theileria equi* (E 5/100 y M 0/100), *Babesia caballi* (E 2/100 y M 2/100) y coinfección (E1/100 y M1/100) (Tabla 6).

Las 11 muestras positivas correspondientes al 11% del total de muestras, fueron encontradas en 4 veredas de las 9 participantes del estudio, la vereda Estaqueca tiene el mayor número de positivos, seguido por Tibrote con un 46% y 36% respectivamente y finalmente la cabecera municipal y Caimito los dos con igual porcentaje del 9% (Tabla 7) (Figura 38).

Tabla 6. Frecuencia de parásitos según las variables (Autoras).

	<i>Theileria equi</i>		<i>Babesia caballi</i>		Coinfección	
VARIABLE	FRECUENCIA	%	FRECUENCIA	%	FRECUENCIA	%
SEXO						
MACHO ♂	4	4	2	2	1	1
HEMBRA ♀	1	1	2	2	1	1
	p= 0.555		p= 0.431		p= 0.581	
ESPECIE						
EQUINO (E)	5	5	2	2	1	1
MULAR (M)	0	0	2	2	1	1
	p=0.223		p= 0.168		p= 0.334	

Tabla 7. Distribución de muestras positivas según vereda en la cual residen (Autoras).

VEREDA	NUMERO	%
CAIMITO	1	9
CABECERA MUNICIPAL	1	9
TIBROTE BAJO	4	36
ESTAQUECA	5	46

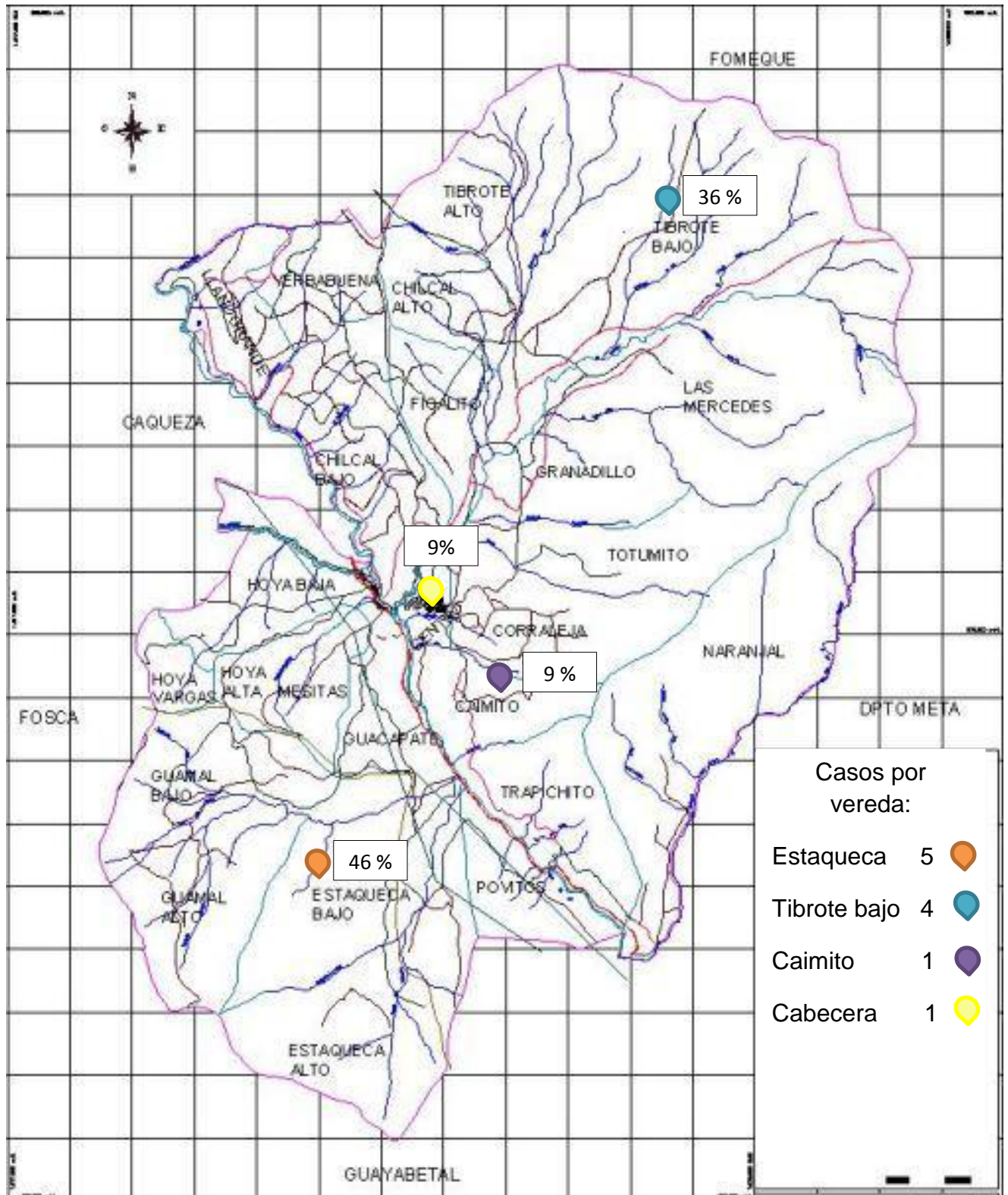


Figura 38. Distribución geográfica de los casos de piroplasmosis encontrados en el municipio de Quetame, Cundinamarca (41).

4.4. ELISA

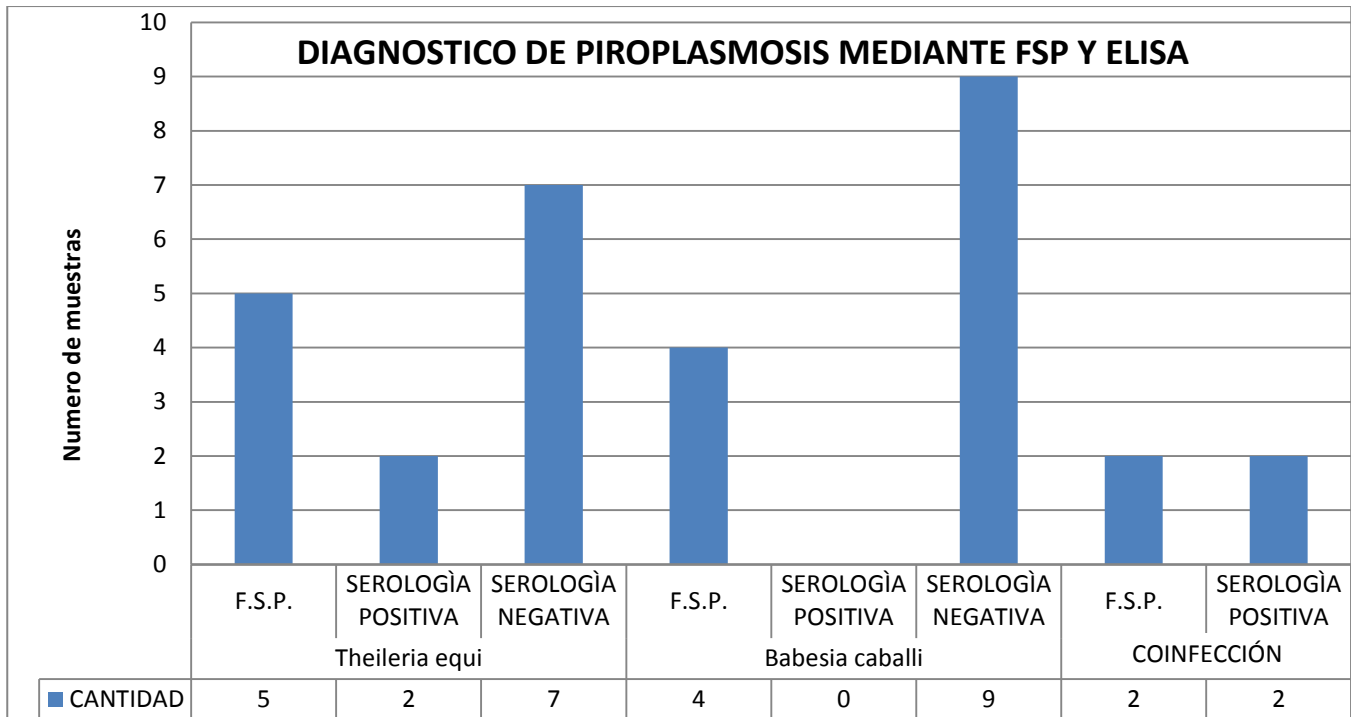
El total de las 11 muestras positivas para los parásitos en FSP luego de ser procesadas mediante la técnica de ELISA competitiva para la búsqueda de anticuerpos de tipo IgG contra *Theileria equi* y *Babesia caballi*, se encontró 2 positivos para *Theileria equi*, 0 positivos para *Babesia caballi* y 2 positivos para coinfección (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados detección de Ac tipo IgG contra *Theileria equi* y *Babesia caballi* mediante ELISA competitiva (Autoras).

DIAGNOSTICO		CANTIDAD
<i>Theileria equi</i>	Serología positiva	2
	Serología negativa	7
<i>Babesia caballi</i>	Serología positiva	0
	Serología negativa	9
Coinfección	Serología positiva	2

4.4. RESULTADOS SEGÚN ELISA Y FSP

La comparación de los resultados encontrados en cada metodología se hizo para evaluar la concordancia entre los mismos, de esta manera con ello evaluar las posibles diferencias en cada uno. Es claro evidenciar la diferencia de los resultados según la metodología utilizada, ya que para *Theileria equi* se encontró en FSP 5 positivos, pero en serología 2, en *Babesia caballi* 4 positivos mediante el FSP, pero en serología 0 y en la infección mixta si se detectó mediante las dos metodologías la positividad de las 2 muestras (Grafica 5).



Gráfica 5. Resultados de los análisis para la detección de los parásitos mediante FSP Y ELISA (Autoras).

Esta discrepancia en los resultados obtenidos en las pruebas se debe principalmente a que: en primer lugar, el FSP solo es capaz de diagnosticar fases de la enfermedad donde los glóbulos rojos están infectados con el parásito, alta parasitemia y en picos febriles; pero no será útil en casos donde el parásito migrado al sistema retículo endotelial, donde el animal podría ser portador asintomático. Por otra parte, la Prueba de ELISA competitiva que se implementó en esta investigación, está diseñada para detectar inmunoglobulinas de memoria (IgG). Por lo tanto, esta prueba será incapaz de diagnosticar fases tempranas de la enfermedad, donde solo se encuentran presentes anticuerpos de respuesta inmediata (IgM) y etapas de ventana inmunológica donde la concentración de IgG no es suficientemente alta como para ser detectada (Figura 32).

De tal manera, las muestras encontradas positivas mediante el análisis del FSP, pero negativas por la ELISA, cursaban por etapas tempranas de la enfermedad donde los protozoarios estaban presentes en sangre periférica, posiblemente con títulos altos

de IgM y títulos muy bajos o inexistentes de IgG. Ahora bien, en los dos casos encontrados con infección mixta, no se puede determinar el momento del contagio de los parásitos.

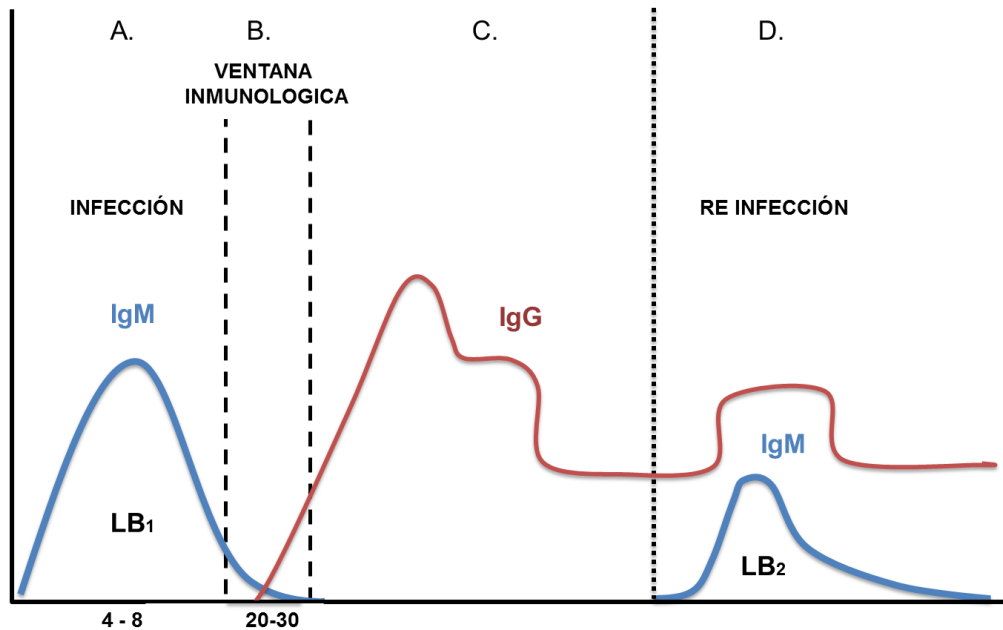


Figura 32. A. luego del reconocimiento del parásito, los Linfocitos B₁ producen IgM, el pico máximo de esta se encuentra en los días 4 – 8 post infección. B. En los días 20 – 30, se cursa por una etapa de ventana inmunológica, donde los títulos de IgM van disminuyendo hasta desaparecer y se comienza la producción de IgG, debido a ello sus títulos son indetectables. C. En esta etapa la IgG realiza un pico para luego decaer y mantenerse constante de por vida. D. En una reinfección los linfocitos B₂ producen IgM, pero en menor concentración que en la primo infección y la IgG incrementa hasta que se elimina el parásito, disminuye de nuevo y vuelve a su concentración constante (Autoras).

5. DISCUSIÓN

La piroplasmosis desencadena múltiples síntomas que alteran el estado de salud del animal, radicando en ello su importancia a nivel sanitario y económico; esta se encuentra incluida en la lista de enfermedades de notificación obligatoria a las entidades encargadas de la salud animal como lo son el ICA a nivel nacional y la OIE a nivel internacional³⁷. El presente estudio se realizó con el fin de establecer casos de piroplasmosis en equinos y mulares de 4 veredas del municipio de Quetame, demostrando así la existencia de casos de esta enfermedad en dicho municipio; representando alto riesgo de contagio en municipios vecinos del departamento de Cundinamarca.

Los resultados hallados en los 100 FSP teñidos con Wrigth, se evidencio un 11% de positividad para *Babesia* y/o *Theileria*, estos resultados son comparables con el estudio realizado por Calderon et al¹⁶; donde, en el análisis de 126 muestras recolectadas en el municipio de Montería (Córdoba), se diagnosticaron 18.25% de positividad para *Babesia spp.* El municipio de Quetame (Cundinamarca) tuvo una menor frecuencia con respecto a Montería (Córdoba), a pesar de ello se debe mencionar la diferencia en el tamaño de la muestra en ambos casos, siendo así similar la frecuencia entre ellos. Es importante mencionar la variación que existe en la altura sobre el nivel del mar entre ambos municipios, ya que esto no represento un indicador para la existencia o no de enfermedad. En contraste, en un estudio hecho en dos municipios de Cuba, se analizaron 58 FSP mediante la coloración de Giemsa, donde obtuvieron 3 muestras con *Babesia caballi*, 8 con *Theileria equi* y ninguna con coinfección en comparación con los resultados obtenidos en el presente estudio donde 4 tenían *Babesia caballi*, 5 *Theileria equi* y 2 con coinfección. Se encuentra que las dos tinciones poseen similitud en cuanto a la efectividad para el diagnóstico ya que permiten la visualización de las estructuras parasitarias⁴³.

Por otro lado, es común el reporte de coinfecciones, como es el caso de un estudio realizado en Irán por Malekifard et al.⁴⁴; donde de un total de 240 muestras, 2 se encontraron positivas para los dos parásitos mediante la técnica de PCR. Similar a

los resultados obtenidos en la presente investigación, donde de igual manera 2 ejemplares cursaban con coinfección. Así mismo, un estudio desarrollado en China en la provincia de Jilin en 111 muestras se demostró por medio de ELISA competitiva que 14 tenían infección mixta⁴⁵. Se desconoce a ciencia cierta cómo se da este tipo de infección, pero en algunos casos se refiere a la capacidad del vector de vehiculizar ambos parásitos al tiempo.

Además del FSP existen diferentes técnicas más sensibles para el diagnóstico *Theileria equi* y *Babesia caballi*, las cuales permiten realizar la medición de anticuerpos generados por el animal infectado para el posterior análisis de la seroprevalencia de la enfermedad. En cuanto al estudio serológico, se llevó a cabo mediante la técnica de ELISA competitiva resultando que de las 11 muestras positivas encontradas en FSP solo 4 de estas tenían anticuerpos tipo IgG contra *Theileria equi* o *Babesia caballi*. En contraposición en la investigación desarrollada por Peña en Guatemala para el año 2009, donde también se hizo el análisis de 100 muestras, 15 resultaron positivas en FSP y en ELISA competitiva 51 positivas²⁸. En dicho estudio se menciona que la ELISA para la detección de IgG, diagnostica mayor cantidad de positivos, argumentando la existencia de los anticuerpos desde que los animales son infectados hasta varios años después, contrario a ello se sabe que las inmunoglobulinas tipo IgG son producidas de 20-30 días después de la entrada del parásito al torrente sanguíneo y que estas proteínas se comportan generando picos según el estado de la enfermedad. Por otra parte, en ese estudio no se tuvo en cuenta la posibilidad de diagnosticar falsos negativos en FSP debido a que, en etapas prolongadas de la enfermedad, el parásito puede ser vehiculado al sistema retículo endotelial, siendo este indetectable en sangre periférica.

Son pocos los estudios que se hacen en mulas. Luego de una investigación exhaustiva no se encontró ningún tipo de investigación de este tipo en mulares en nuestro país. A pesar de ello, como se evidencio en el presente trabajo estos animales también son susceptibles a contraer la enfermedad, no solo mediante de la picadura de la garrapata, sino que también vía transplacentaria, como es descrito en un estudio en Sao paulo, para el año 2018 donde se ve este tipo de trasmisión de yeguas a sus

potros de mulas, tanto de *Theileria* como de *Babesia*⁴⁶. Pero, sigue siendo muy poca la información que se tiene de estos animales.

El análisis de las diferentes variables y factores de riesgo, arrojó como resultado poca relevancia para el estudio, ya que el contagio de la infección no depende del sexo, de la especie ni del lugar de residencia del animal, es posible que las condiciones ambientales tengan un papel fundamental en la transmisión de estos parásitos debido a la alta movilidad de los especímenes entre veredas y departamentos, teniendo en cuenta las condiciones climáticas que tiene Colombia. En la mayoría de los casos citados a lo largo del escrito, estas variables no son determinantes, debido a que la piroplasmosis se puede contagiar siempre y cuando, el espécimen este en contacto con el vector, el habitat sea propicio para adquirir la enfermedad o el personal a su cargo no implemente buenas prácticas pecuarias.

Para concluir, este estudio no solo representa una investigación científica de aporte epidemiológico. Sino que también, permite observar como este tipo de experiencias en un país que cursa por una etapa de post conflicto, genera medios de acercamiento e inclusión entre la comunidad y entidades como lo es la Policía Nacional, generando espacios donde las dos partes se hallan beneficiadas; por un lado, el campesino que recibe atención médica para sus animales y, por otro lado, los funcionarios de dicha entidad que pueden ver recuperada la confianza y respeto de la comunidad para su institución, escuchando las necesidades y expectativas de la misma, generando proyectos, jornadas y actividades beneficiosos para la población en general.

6. CONCLUSIONES

- Las buenas prácticas de toma de muestra, el embalaje y un transporte adecuado permite garantizar la calidad y conservación de la muestra, asegurando así un buen proceso preanalítico otorgándole confiabilidad a los resultados.
- Mediante el análisis de los FSP se encontró un mayor porcentaje de infección por *Theileria equi* con un 46% frente a *Babesia caballi* con un 36% en el municipio de Quetame.
- El contagio de la enfermedad no se encuentra relacionado con el sexo y la especie, siendo probable que la infección se adquiriera por las condiciones del habitat y el empleo del animal.
- Es posible que los dos parásitos estén presentes en un individuo al tiempo generando así casos de coinfección. A pesar de ello es importante mencionar que para determinar si el contagio fue primero de uno o del otro o simultaneo, es necesario la medición de anticuerpos tipo IgM e IgG.
- El diagnóstico de piroplasmosis mediante la detección de anticuerpos de tipo IgG por la técnica ELISA competitiva solamente determina dicha enfermedad en los casos con presencia de IgG, dejando de lado infecciones en las que no se han generado anticuerpos de memoria, evidenciando solo los de respuesta inmediata (IgM) y posibles infecciones que cursan por ventana inmunológica donde los títulos de la IgG son indetectables.
- El FSP es una técnica sencilla, rápida, económica y de gran valor diagnostico siendo esta predictora de múltiples patologías y una de las pruebas más útiles para el diagnóstico de parásitos intracelulares. En contraposición, es ineficaz en etapas tardías de la piroplasmosis ya que el parasito no está en sangre periférica si no que ha migrado a sistema retículo endotelial.
- En cuanto a la población de equinos y mulares del municipio de Quetame que participaron en el estudio, se encontró que el mayor porcentaje son equinos machos seguido por las hembras de la misma especie. Es importante recalcar que no se tiene un censo real de la población de estos animales en el municipio,

así que con la investigación realizada se obtuvo un estimado de la situación poblacional de estos animales.

- La participación de la comunidad superó las expectativas establecidas ya que se estipulaba una población aproximada de 50–70 equinos y mulares que participarían en el estudio; de tal manera se favoreció la salud de estos y se dio un gran paso en el conocimiento de la realidad poblacional de dichos animales.
- En la búsqueda exhaustiva que se realizó para la consecución de este estudio, no se encontró información previa de análisis en mulares en Colombia. De tal manera, que este es el primer estudio de este tipo donde se incluye a mulares.
- La falta de un diagnóstico oportuno nos impide conocer la realidad de las enfermedades que atañen la salud de equinos y mulares. Un claro ejemplo son las patologías detectadas en la presente investigación, aclarando que, de no ser por los exámenes realizados en este estudio, no se habría conocido de su presencia en el municipio. Debido a que esta patología es poco conocida, y no se le da la importancia necesaria al cuidado y sanidad de los equinos y mulares.
- La realización de este tipo de jornadas permite a la comunidad urbana y rural recibir beneficios de diferentes entidades, en este caso no solo de la UTA, sino también de los estudiantes y de la Policía Nacional, entidad que vela por la seguridad de los colombianos, pero que además procura por el acercamiento a la población brindando el conocimiento y servicio de sus profesionales.

7. RECOMENDACIONES

Es necesaria la investigación de la piroplasmosis en el territorio nacional para conocer el estado epidemiológico de la enfermedad, realizar el control y prevención de la misma, esto debido al desconocimiento que se tiene frente a ella además de su errado diagnóstico. Se hace la recomendación de realizar censos tanto de equinos como de mulares, que permitan reconocer el estado poblacional de estos animales en Colombia. Adicionalmente es importante que la comunidad conozca no solo de la piroplasmosis, sino que también de otras enfermedades que pudiesen ser transmitidas por garrapatas o malas prácticas pecuarias, mediante la realización de programas de educación al propietario para que este realice pruebas diagnósticas a los animales no solo en el caso de movilidad si no para la prevención de la enfermedad y difusión de la misma.

Es importante la generación de conocimiento a través de investigaciones que permitan discernir sobre la capacidad infectiva del parásito. Además, de la manera como hace que un ejemplar tanto equino como mular sea portador asintomático. También se cree importante el llevar a cabo más estudios de estos en nuestro país ya que como lo indicamos se tiene registro solo de un estudio publicado, esto para poder reconocer mejor la realidad de esta patología en Colombia.

Se considera hacer énfasis en el valor diagnóstico que tiene el FSP, que permite no solo hacer un diagnóstico rápido y económico de la piroplasmosis, sino que también da idea del estado de salud del animal. La ejecución de este método en conjunto con otras técnicas serológicas o moleculares permiten encontrar la enfermedad en cualquier estado evolutivo de la misma, por ello las entidades encargadas del diagnóstico deberían realizar los análisis mediante la combinación de distintas metodologías.

Por último, se hace un llamado a la comunidad científica para realizar estudios ya sea genéticos, inmunológicos o poblacionales en los mulares, ya que, es poco lo que se conoce de estos animales a pesar de que cuentan con mayor resistencia ante las enfermedades y poseen mejor desempeño y fortaleza para desarrollar las labores diarias, con respecto a los equinos.

8. ESTRATEGIA DE COMUNICACIÓN

Al final de la investigación se hizo la entrega de los resultados de los análisis realizados y socialización de la enfermedad al grupo de concejales y el personal de la UTA, en un consejo extraordinario citado por la alcaldía del municipio. Cada resultado fue entregado al propietario por la UTA en reuniones citadas por este personal, donde el médico veterinario realizo la capacitación y socializaciones de la enfermedad, además de la interpretación de los resultados de los exámenes clínicos realizados a sus animales, y dado el caso el respectivo tratamiento



Figura 33. Entrega de resultados y socialización ante el consejo del municipio y el personal de la UTA (Autoras).



Figura 34. Entrega de resultados y recomendaciones a los propietarios por parte del médico veterinario de la UTA (Autoras).



Figura 35. Socialización de los resultados y capacitación frente a la enfermedad por parte de la UTA a la comunidad rural (Autoras).

8. REFERENCIAS

- ¹Animal and Plant Health Inspection Service, Piroplasmosis equina. [Hoja informativa]. United States Department of Agriculture [internet] 2008 [citado 01 oct 2017]. Disponible en: https://www.aphis.usda.gov/publications/animal_health/content/printable_version/fs_equine_piro_sp.pdf.
- ²Wise, L., Kappmeyer, L., Mealey, R. y Knowles, D. (2013), Revisión de la piroplasmosis equina. J Vet Intern Med, 27: 1334-1346. doi: 10.1111 / jvim.12168 internet [citado Ene 31 2018] Disponible en : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jvim.12168>.
- ³Prochno H. Scorsin L. Rodriguez F. Baldani C. Falbo M. Thomaz L. et al. Seroprevalence rates of antibodies against *Theileria equi* in team roping horses from central-western region of Paraná. 2014 Brasil. Rev parasitol vet 23. :1 [internet] [Citado Ene 31 2019] Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612014000100013.
- ⁴ICA ICA-. ICA. [Online].; 2014 [cited 2018. Available from: [https://www.ica.gov.co/Noticias/Pecuaría/2013-\(1\)/El-ICA-habilita-importaciones-de-equinos-para-repr.aspx](https://www.ica.gov.co/Noticias/Pecuaría/2013-(1)/El-ICA-habilita-importaciones-de-equinos-para-repr.aspx).
- ⁵Epidemiológica SdPADTdV. Instituto Colombiano Agropecuario – ICA. [Online].; 2015 [cited 2018. Available from: <https://www.ica.gov.co/getattachment/4d163775-d3d8-47ab-92ba-fa5a0140bfdc/2015.aspx>.
- ⁶Cundinamarca AdQ. Alcaldía de Quetame. [Online].; 2016 [cited 2018. Available from: http://www.quetame-cundinamarca.gov.co/informacion_general.shtml#identificacion
- ⁷Gonzales J. Babesiosis humana en regiones epidemiológicamente aptas para la transmisión de malaria y babesia humana: Estudio molecular de garrapatas, bovinos y humanos. Medellin. Colombia 2016. (Trabajo de grado para la obtención del título Magister en epidemiología) Universidad de Antioquia. [internet] Citado 2019 Ene 30. Disponible en: http://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/3621/1/Babesiosishumana-Humanabovina_JGonz%C3%A1lez-2016.3.pdf

- ⁸Genchi C, Human babesiosis, an emerging zoonosis, *Parassitologia*, [Vol 49 pp 29-31] 2007. [internet] Citado 2019 Ene 30. Disponible en: <file:///C:/Users/Hp/Downloads/ParassitologiaVol.492007.pdf>
- ⁹Rodrigo H. R. Diagnostico por la infección de *Babesia caballi* y *Babesia* (*Tehileria*) equi por método de ELISA en caballos de Torreon, Coahuila, México. 2011 (trabajo de grado para la obtención del título Médico veterinario zootecnista) Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". [internet] Citado 2019 Ene 30. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3221/RAUL%20RODRIGUEZ%20HERNANDEZ.pdf?sequence=1>
- ¹⁰Rudolph J. Correa L. Zurita W. Manley. Piroplasmosis equina: respuesta leucocítica a *Babesia equi* (Levaran 1901) Infección en Chile. Septiembre- Octubre 1975. *Revista veterinaria Británica*. 131.(5): 601-609. [Internet] [citado 28 feb 2019] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007193517351941>.
- ¹¹Aguirre, DH, Cafrune, M, Rada, M, Torioni de Echade, S. Babesiosis clínica en equinos de Cerrillos, Salta, Argentina. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias* [Internet]. 2004;33(3):123-133. [internet] [citado 28 feb 2019] Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86433308>.
- ¹²Vera M. Guillen A.T. Garcia F. Contreras R. Sierralta A. et al. Seroprevalencia de la babesiosis equina en caballos purasangre de carrera alojados en los hipódromos la Rinconada y Nacional de Valencia, Venezuela. 2006, *Veterinaria Trop* (31. 1-2 43-52) Citado 2019 Ene 30. Disponible en: http://www.sian.inia.gob.ve/revistas_ci/VeterinariaTropical/vt31/pdf/vera_m.pdf.
- ¹³Reina L, Tovar D, Determinación de hemoparásitos en equinos de vaquería en cuatro predios de los municipios de Agua Azul, Mani, Paz de Ariporo y El Yopal, del Departamento del Casanare. Bogotá 2007 (trabajo de grado para la obtención del título de Médico Veterinario) Universidad de la Salle, Facultad de Medicina Veterinaria [Internet] [citado 28 feb 2019] Disponible en: <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/5998/T14.07?sequence=1>
- ¹⁴Kouam M.K, Kantzoura V, Masuoka P, Gajadhar A, Theodoropoulos G. Diversidad genética de los piroplasmas equinos en Grecia con una nota sobre la especiación dentro de los genotipos de *Theileria* (similar a *T. equi* y *T. equi*). Octubre de 2010. *Infección, genética y evolución*. 10.(7):963-968. [Internet] [citado 28 feb 2019] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134810001723>

- ¹⁵Pitel P.H, Pronost S, Scrive T, Leon A, Richard E, Fortier G,. Deteccion molecular de *Theileria equi* y *Babesia caballi* en la medula ósea de caballos asintomáticos. Mayo 2010. Parasitologia veterinaria. 170(1-2): 182-184. [internet] [citado 28 Feb 2019] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401710000774>.
- ¹⁶Calderón A. Cardona J. Vergara O. Frecuencia de Babesia spp. en caballos de Montería Córdoba, Colombia. UDCA [internet] 2013 [consultado 2017 Oct 27].. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v16n2/v16n2a20.pdf>
- ¹⁷Trujillo A. seroprevalencia y factores de riesgo asociados a piroplasmosis en équidos de tres regiones del estado de Veracruz, Mexico. Universidad veracruzana. [internet] 2015 [citado 15 oct 2017]. Disponible en: <https://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/39902/1/Alva%20Trujillo,%20Miriam.pdf>¹⁸ Montes Cortes MG, Fernandez Garcia JL, Habela Martínez MA. Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi*. España. NCBI, PMC. Parasite 2017. (24: 14) [consultado 2017 Oct 28] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5432961/>
- ¹⁸Montes Cortes MG, Fernandez Garcia JL, Habela Martínez MA. Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi*. España. NCBI, PMC. Parasite 2017. (24: 14) [consultado 2017 Oct 28] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5432961/>
- ¹⁹Benavides Montaña Javier A. Jaramillo Cruz Carlos A. Mesa Cabo Nora. Garrapatas Ixodidae (acari) en el Valle del Cauca, Colombia. Colombia boletín científico centro de museos museo de historia natural 2018 [131-150]. ISSN: 0123-3068 [internet] Citado 2018 Nov 28. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v22n1/0123-3068-bccm-22-01-00131.pdf>.
- ²⁰Zanet S, Bassano M, Trisciuglio A, Taricco I, Ferroglio E. Caballos infectados por piroplasmas diferentes de *Babesia caballi* y *Theileria equi*: identificación de especies y análisis de factores de riesgo en Italia. Marzo de 2017. Parasitologia veterinaria. 235: 38-42.[internet] [citado 28 feb 2019] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401717300031>.
- ²¹Strauch A, Castillo Vanegas V, Piedrahita D, Chaparro J, Villar D, Sánchez A, Tobón J, Ortiz Ortega D, Ramírez N, Olivera-Ángel M. Prevalencia de *Babesia caballi*, *Theileria equi* y tripanosomiasis y análisis de factores de riesgo en equinos de Antioquia, Colombia. rudca [Internet]. 26sep.2018 [citado 28feb.2019];21(2):491-00. Disponible en: <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/976>.

- ²² Strauch A, Castillo Vanegas V, Piedrahita D, Chaparro J, Villar D, Sánchez A, Tobón J, Ortiz Ortega D, Ramírez N, Olivera-Ángel M. Proyecto piloto de excelencia sanitaria en equinos del Valle de Aburrá y Rionegro (Antioquia, Colombia) [internet]. [Citado 28 feb 2019] Disponible en: <file:///C:/Users/Hp/Downloads/334588-153926-1-PB.pdf>.
- ²³ Avila Reyes E. A. Buenas prácticas Equinas. Ministerio de agricultura y desarrollo rural, ICA. Sep 2016 [internet] [citado 28 Feb] Disponible en: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Equino/Documentos/005%20-%20Documentos%20T%C3%A9cnicos/Buenas%20Practicas%20Equinas.pdf>
- ²⁴ Malekifard F, Tavassoli M, Yakhchali M, Darvishzadeh R. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* using microscopic and molecular methods in horses in suburb of Urmia, Iran. NCBI, PMC. 2014.5(2):129-133 [citado 2017 Oct 21]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4279624/>
- ²⁵ Animal and Plant Health Inspection Service, Piroplasmosis equina. [Hoja informativa]. United States Department of Agriculture [internet] 2008 [citado 01 oct 2017]. Disponible en: https://www.aphis.usda.gov/publications/animal_health/content/printable_version/fs_equine_piro_sp.pdf.
- ²⁶ College of Veterinary Medicine. Iowa State University. Piroplasmosis [internet]. [consultado 2017 Oct 21]. Disponible en: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/equine_piroplasmosis-es.pdf
- ²⁷ Hernandez Rodriguez Mara Isis. Identificación del vector transmisor de piroplasmosis equina en Terreon, Coahuila. Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro [tesis pregrado]. Medicina veterinaria y zootecnia. 2011. Mexico [Internet] [Consultado 2018 Agos 22] Disponible en: <file:///C:/Users/Hp/Downloads/MARA%20ISIS%20HERNANDEZ%20RODRIGUEZ.pdf>
- ²⁸ Peña Piedrasanta Ana Lucia. Concordancia entre la prueba de cELISA y el frotis sanguíneo como método diagnóstico para babesiosis equina (babesia caballi y theileria equi). [tesis pregrado] Universidad de San Carlos de Guatemala facultad de medicina veterinaria y zootecnia Escuela de medicina veterinaria. 2009 [Internet]. [Consultado 2018 Agos 22]. Disponible en: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/3277/1/Tesis%20Med%20Vet%20Ana%20L%20Piedra%20Pe%C3%B1a%20Piedrasanta.%5B1%5D.pdf>
- ²⁹ Morales DAJR. medigraphic. [Online].; 2007 [cited 2018. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/estudiantil/ace-2007/ace074a.pdf>.

- ³⁰Botteon P., Massard C., De cassia R., Loss Z., Linhares G. Seroprevalencia de Babesia equi en tres diferentes sistemas de crianza de equinos. Rio de Janeiro-Brasil. Parasitol. latinoam. v57 n. 3-4 Santiago [internet] 2002 [consultado 2017 Oct 30]. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-77122002000300010
- ³¹Avila E. ICA Buenas prácticas equinas BPE. Ministerio de agricultura [internet] [Citado Ene 30 2019] Disponible en: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Equino/Documentos/005%20-%20Documentos%20T%C3%A9cnicos/Buenas%20Practicas%20Equinas.pdf>
- ³²MVZ. MSC. Olguín Arturo y Bernal. Piroplasmosis, Universidad Nacional Autónoma de México facultad de medicina veterinaria y zootecnia [internet] citado 2019 Ene 30. Disponible en: http://www.ammveb.net/clinica/piroplasmosis.pdf?fbclid=IwAR1dP04MrHIJTh_6WG8EbAsmz97BnkIXGFhBYaYMcXXN5G8yvXPLGoswox4
- ³³Garcia Paz Jose L. evaluacion de las propiedades acaricidas de Piper crassinervium Kunth. Piper aequale Vahl. (piperaceae) sobre larvas de Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887) (ACARI: IXODIDAE) [Trabajo De Grado Para Optar El Título De Magister En Ciencias Agrarias Área Producción Animal Tropical] Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias agropecuarias coordinación general de postgrados PALMIRA. 2011. [internet] Citado 2018 Nov 28. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/6369/1/7408505.2011.pdf>
- ³⁴Equisan. Veterinaria equina integral. España [internet] [consultado 2018 Agos 22]. Disponible en: <http://www.equisan.com/images/pdf/babe.pdf>
- ³⁵Manual terrestre de la OIE 2014.Piroplamosis equina. Versión adoptada por la asamblea mundial de delegados de la OIE en mayo de 2014. Cap 2.5.8 [citado 2018 Ags 21] Internet. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.05.08_%20Piroplasmosis_equina.pdf
- ³⁶Morales A. Villoria D. Romero N. Morales G. kassar M. Arrieta D. Comerma S. Estudio comparativo de la eficacia terapéutica de oxitetracilina, imidocarb y diaminazeno, utilizados en el tratamiento de hemoparásitos en equinos pura sangre de carrera. Rev Ibero latinoam (2012) 71: 1 (78-82) [internet] [citado Ene 30 2019] Disponible en: https://pure.au.dk/ws/files/102037699/98_1_7.pdf

- ³⁷OIE World Animal Health Information System, Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2019, [internet] Citado 2019 Ene 30. Disponible en: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2019/>
- ³⁸OIE, World Animal Health Information System, Base de datos de información sanitaria mundial (Interfaz WAHIS) - Versión 1. Mapas de distribución de enfermedades.2018 [internet] Citado 2019 Ene 30. Disponible en http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home
- ³⁹OIE World Animal Health Information System, Distribucion de Piroplasmosis quina entre 2015 a 2018 en America [Internet] Citado 2019 Ene 30. Disponible en: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statuslist
- ⁴⁰OIE World Animal Health Information System. Incidencia detallada de la enfermedad por país, número de nuevos brotes reportados. [internet] Citado 2019 Ene 30. Disponible en: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail.
- ⁴¹Cundinamarca AdQ. Alcaldía de Quetame. [Online].; 2016 [cited 2018]. Available from: http://www.quetame-cundinamarca.gov.co/informacion_general.shtml#identificacion.
- ⁴²Alcaldia de Qutame 2016-2019. Página de Facebook. 2018 [internet] [Citado Ene 30 219] Disponible en: <https://www.facebook.com/Yoamoquetame/>
- ⁴³Diaz A. Fonseca O. Castillo S. Dorta Y. Lobo E. et al. Hematological alterations found in horses (*Equus caballus*) infected with *Babesia caballi* and *Theileria equi*. *Rev. Salud Anim.*, Vol. 40, No. 1 (enero-abril 2018), ISSN: 2224-4700. [internet] [Citado Mar 26 2019] Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v40n1/rsa05118.pdf>
- ⁴⁴Malekifard F. Tavassoli M. Yakhchali M. Darvishzadeh R. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* using microscopic and molecular methods in horses in suburb of Urmia, Iran. *NCBI, PMC*. 2014.5(2):129-133 [consultado 2017 Oct 21]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4279624/>.
- ⁴⁵Xu Y. S Zhang S. Huang X. Xuan X. Fujirashi I. Kabeya H. Maruyama S. Seroepidemiologic Studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* Infections in Horses in Jilin Province of China. China, 2003. [internet] [Citado Mar 26 2019] Disponible en: https://www.istage.ist.go.jp/article/jvms/65/9/65_9_1015/article/-char/ja/

⁴⁶Françoso R. Riccio AV. Fernandes C. Alonso M. Belli C. Transmisión transplacentaria de Theileria equi en mulas: ¿Debemos preocuparnos? 2018 Sao Pablo, Brasil. Vet Parasitol. 2018 15 de diciembre; 264: 39-41. [internet] [citad mar 26 2019] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30503089>

9. ANEXOS

Anexo 1. Encuesta: Diagnostico de piroplasmosis equinos y mulares del municipio de Quetame.



IDENTIFICACION:

Encuesta N° _____ Fecha _____

Propietario: _____ Teléfono: _____

Identificación del Equino: _____ Edad: _____


Vereda: _____ Sexo: M ___ F ___ Especie: Equino ___ Mular ___

ESTADO DEL ANIMAL:

1. El animal tiene o a tenido garrapatas: SI ___ NO ___
2. El animal alguna vez ha sido vacunado: SI ___ NO ___ Cual? _____
3. El animal alguna vez ha sido desparasitado: SI ___ NO ___

Observaciones: _____

Anexo 2. Guía para prueba de ELISA competitiva para la detección de anticuerpos con Kit comercial.

 SUBGERENCIA DE ANÁLISIS Y DIAGNÓSTICO		ELISA COMPETITIVA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CON KIT COMERCIAL	
Agente: <u>B. caballi</u>	No. de Ensayo: <u>Bc1858</u>		
Fecha: <u>2018 12</u>	Especie: <u>Equino</u>		
KIT USADO:	Marca y No. de lote: <u>Vmrtd / P170607-001</u>	Fecha de Vencimiento: <u>2019-09-18</u>	
CONTROL DE PREPARACIÓN DE SOLUCIONES			
Solución de Lavado <u>1 X</u> Lote: <u>P170224001W</u>	Cálculo: $V_F = C \times V \times 300 \mu l \times 3 \times 4 = 172800 \mu l$ $172,8 \text{ ml} \approx 200 \text{ ml} \Rightarrow V_i = \frac{(1X) \times 200 \text{ ml}}{10X} = 20 \text{ ml}$		
• Solución concentrada <u>10 X</u> : <u>20</u> ml			
• Agua destilada: <u>180</u> ml			
CONTROL DE PROCEDIMIENTO			
Indicación: Ubicar en la casilla un visto bueno (✓) cada vez que se culmine un paso del procedimiento analítico y si éste tiene algún dato complementario diligenciar los espacios o marcar con X en la casilla correspondiente, NA para el caso de No Aplica.			
<input checked="" type="checkbox"/>	Alistar el material y verificar los equipos a usar en el ensayo		
<input checked="" type="checkbox"/>	Efectuar la distribución en la placa, relacionar el Suero problema (SP), control positivo (CP) y negativo (CN) (Página siguiente) e ingresar en el software o programa correspondiente		
<input checked="" type="checkbox"/>	Realizar la pre-dilución <u>1:2</u> del SP, CP y CN en buffer de dilución de sueros (tubos embalados en gradillas o placa)		
	Diluyente: <u>Serum Diluting Buffer</u>	No. de Lote: <u>P170224001S</u>	
<input checked="" type="checkbox"/>	ADICIÓN DEL SUERO Y CONTROLES: Adicionar <u>50</u> µl por pozo del SP o controles pre diluidos		
	Dilución final: <u>1:2</u>	Lote CP Usado: <u>P170224001P</u>	Lote CN Usado: <u>P170607001N</u>
<input checked="" type="checkbox"/>	Incubar a T° ambiente (23 ± 2°C) por <u>30</u> min T°C/Hora inicial: <u>20,3°C / 10:08</u> T°C/Hora Final: <u>20,9°C / 10:38</u>		
<input checked="" type="checkbox"/>	Lavar la placa <u>3-4 X</u> (número de veces) y con <u>300</u> µl por pozo de solución de lavado: Manual <input checked="" type="checkbox"/> Mecánicamente <input type="checkbox"/>		
<input checked="" type="checkbox"/>	ADICIÓN DE ANTICUERPO PRIMARIO: Adicionar <u>50</u> µl por pozo a dilución óptima (reactivo + diluyente de anticuerpo)		
	Reactivo: <u>100X Primary Antibody</u>	No. de Lote: <u>P170224001M</u>	
	Diluyente: <u>Antibody Diluting Buffer</u>	No. de Lote: <u>P170224001AB</u>	
	Dilución usada: <u>1X</u>	Reactivo: <u>30</u> µl	Diluyente: <u>CSP 3</u> ml
Cálculo: $V_F = 6 \times 8 \times 50 \mu l = 2400 \mu l$ $V_F \approx 3000 \mu l$			
$V_i = \frac{1X \times 3000 \mu l}{100X} = 30 \mu l \text{ Reactivo}$			
<input checked="" type="checkbox"/>	Incubar a T° ambiente (23 ± 2°C) por <u>30</u> min T°C/Hora inicial: <u>20,9°C / 10:46</u> T°C/Hora Final: <u>20,9°C / 11:16</u>		
<input checked="" type="checkbox"/>	Lavar la placa <u>3-4 X</u> (número de veces) y con <u>300</u> µl por pozo de solución de lavado: Manual <input checked="" type="checkbox"/> Mecánicamente <input type="checkbox"/>		
<input checked="" type="checkbox"/>	ADICIÓN DE ANTICUERPO SECUNDARIO: Adicionar <u>50</u> µl por pozo a dilución óptima (reactivo + diluyente de anticuerpo)		
	Reactivo: <u>100X Secondary Antibody Peroxidase Conjugate</u>	No. de Lote: <u>P170224001CS</u>	
	Diluyente: <u>Antibody Diluting Buffer</u>	No. de Lote: <u>P170224001AB</u>	
	Dilución usada: <u>1X</u>	Reactivo: <u>30</u> µl	Diluyente: <u>CSP 3</u> ml
Cálculo: <u>Cálculo igual de AcM Primario</u>			
<input checked="" type="checkbox"/>	Incubar a T° ambiente (23 ± 2°C) por <u>30</u> min T°C/Hora inicial: <u>20,6°C / 11:23</u> T°C/Hora Final: <u>20,5°C / 11:53</u>		
<input checked="" type="checkbox"/>	Lavar la placa <u>3-4 X</u> (número de veces) y con <u>300</u> µl por pozo de solución de lavado: Manual <input checked="" type="checkbox"/> Mecánicamente <input type="checkbox"/>		
<input checked="" type="checkbox"/>	ADICIÓN DEL SUBSTRATO: Adicionar <u>50</u> µl por pozo del substrato		
	Reactivo: <u>Substrate Solution</u>	No. de Lote:	Cantidad: ml
<input checked="" type="checkbox"/>	Incubar a T° ambiente (23 ± 2°C) por <u>15</u> min en oscuridad T°C/Hora inicial: <u>20,7°C / 12:06</u> T°C/Hora Final:		
*No. de ensayo: Siglas del agente (Bc o Te), Año (Dos últimos números) - Consecutivo.			