



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

TÍTULO DE TESIS

**DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE PIROPLASMOSIS
EQUINA (*Theileria equi*) MEDIANTE EL USO DE PCR Y FROTIS
SANGUÍNEO COMO MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN EL
HIPÓDROMO PRESIDENTE REMÓN CANTERA**

LILIEITH LORAINÉ RODRIGUEZ JARAMILLO

8-955-1582

ASESOR INTERNO DR. DAVID GÓMEZ

PANAMÁ, PANAMÁ
REPÚBLICA DE PANAMÁ

2024

**DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE PIROPLASMOSIS
EQUINA (*Theileria equi*) MEDIANTE EL USO DE PCR Y FROTIS
SANGUÍNEO COMO MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN EL
HIPÓDROMO PRESIDENTE REMÓN CANTERA**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN SOMETIDO PARA OPTAR POR EL
TÍTULO DE DOCTOR EN MEDICINA VETERINARIA**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**PERMISO PARA SU PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O
PARCIAL DEBE SER OBTENIDA DE LA FACULTAD DE
MEDICINA VETERINARIA**

APROBADO:

DR. DAVID GÓMEZ:

(ASESOR)

DEDICATORIA

A mi familia,

Esta tesis es el resultado de su amor, apoyo y sacrificio.

Dedico de manera muy especial a mi Querida Madrina y mi Segunda Mamá, Gisela Jaramillo, cuya luz continúa iluminando mi sendero desde el cielo. Tu amor eterno, apoyo incondicional, sabiduría y risa resonarán siempre en mi corazón. Tu recuerdo siempre estará conmigo y sé que estarías orgullosa de todo lo que he logrado.

A mi adorada Mamá, Natividad Jaramillo, por estar siempre ahí para mí, a pesar de todo, gracias por alentarme a perseverar, a hacer las cosas con integridad y a mantenerme firme sin dejarme afectar por las adversidades. Cuyo sacrificio y amor infinito han sido mi refugio en las tormentas. Tú eres la fuente de mi fortaleza. has cultivado con sabiduría, valores y paciencia lo que ahora se refleja en quien soy. Eres, sin duda, la mejor Mamá.

A mi Hermanito Querido, Adonio Junior, por darme su amor incondicional, por siempre brindarme su ayuda cuando la he necesitado y por siempre contar contigo en todo momento. Juntos hemos tejido memorias que son tesoros para toda la vida.

A mi Papá, Adonio Rodríguez, por estar siempre ahí para mí, por apoyarme en todo momento, darme consejos y quererme tanto.

A mi Padrastro, Jorge Iván, por su apoyo, amor y comprensión.

A mis tíos, por su apoyo, su motivación a seguir adelante.

A mi novio, Geovanny Gabriel, por su amor verdadero, por confiar en mis capacidades. Por siempre motivarme a no darme por vencida. Por siempre creer en mí y de lo que soy capaz. Por enseñarme muchas cosas en la cual no sabía que iba a ser capaz como lo es en la cirugía, gracias por siempre estar dispuesto a enseñarme lo que más sabes hacer y por compartirme en todo momento tus conocimientos. Por ser mi apoyo emocional. Te admiro y Te amo mucho.

A la familia Barroso Núñez, Geovanny Barroso, Doris Núñez y Candy Candy, por abrir sus corazones y hogar para mí. Por su apoyo, enseñanzas, amor y por estar al pendiente de mí.

Dedico esta tesis a las personas más importantes de mi vida y las que me han dado fuerza y motivos para nunca rendirme. Como en todos mis logros, gracias por estar presentes, Quiero que siempre estén orgullosos de mí.

Los amo con todo mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Ante todo, le doy gracias a Dios, porque me ha permitido estar aquí presente con salud y vida para ver cumplir un sueño y meta más en mi vida desde que inicie mis estudios primarios, secundarios y universitarios para recibir el título de Dra. en Medicina Veterinaria, en nuestra casa de Estudio Domo Universitario, Universidad de Panamá.

Al llegar aquí, después de haber recorrido todos estos años y doy un vistazo hacia atrás puedo sentirme orgullosa por todo lo aprendido con docentes que fueron estrictos, duros difíciles, pero hoy día, esa dureza me ayudo a levantarme.

Le doy gracias al Decano Alexander Pérez, que me abrió las puertas para que pudiera desarrollar la parte técnica de mi tesis, con la adquisición de los kits y poder así, realizar las pruebas de PCR y culminar con éxito todas las pruebas trazadas para desarrollar y presentar esta tesis.

Deseo agradecer de corazón al Doctor Luis Von Chong, por su incansable ayuda en conseguir y seleccionar a los caballos del Hipódromo Presidente Remón Cantera para poder realizar la toma de muestras y desarrollar dicho tema.

A mi asesor de tesis el Doctor David Gómez, por su ayuda en el proyecto de tesis.

Para la Licenciada Stephanie Bosquez, quien representa a la empresa Sea Technology; por su ayuda desmedida para con mi persona en el laboratorio de la

facultad de Medicina Veterinaria procurando de que todos los lineamientos se siguieran al pie de la letra, con la inducción para el desarrollo de todas las pruebas. Agradecerle al personal de laboratorio a Marlis y Antonio, por siempre estar a la disposición de cualquier cosa que yo necesitara.

A todas y cada una de las personas que de una u otra forma estuvieron presentes y fueron de gran ayuda para la realización de este gran proyecto de tesis.

A su vez que esta tesis quede como material de apoyo y un gran aporte para investigaciones y proyectos de futuras generaciones.

LILIEETH LORAINÉ RODRÍGUEZ JARAMILLO

RESUMEN

Se llevo a cabo un estudio descriptivo de prevalencia con un enfoque transversal centrado en la Piroplasmosis equina (*Theileria equi*) en el Hipódromo Presidente Remón Cantera. El objetivo primordial fue generar información científica para potenciar el diagnóstico de *Theileria equi*, integrando técnicas avanzadas como la amplificación de ácido nucleico junto con el análisis tradicional de frotis sanguíneos.

La muestra comprendió 40 equinos, a los cuales se les practicó la extracción de sangre. Este procedimiento fue seguido por un procesamiento exhaustivo que abarcó cada fase de la técnica de amplificación de ácido nucleico, complementado con el análisis detallado de frotis sanguíneos.

Los resultados no solo ofrecen una visión precisa de la prevalencia de *Theileria equi* en el entorno del hipódromo, sino que también resaltan la eficacia y complementariedad de las técnicas diagnósticas empleadas. Este enfoque integral, que incorpora métodos convencionales y de vanguardia, contribuye significativamente a la mejora de los protocolos de diagnóstico y, por ende, a la gestión efectiva de la Piroplasmosis equina en poblaciones equinas críticas, como las del ámbito deportivo.

En el análisis específico de la población de 40 caballos, la prueba de PCR reveló un caso positivo y 39 casos negativos. A su vez, la prueba de frotis sanguíneo no registró casos positivos, mostrando resultados negativos en todos los casos. La conjunción de estos resultados subraya la utilidad de la combinación de técnicas para una evaluación integral y precisa de la presencia de *Theileria equi* en la población estudiada.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
1.2 ANTECEDENTES	13
1.3 JUSTIFICACIÓN.....	16
1.4 OBJETIVOS.....	18
1.4.1 Objetivo General.....	18
1.4.2 Objetivos Específicos	18
1.5 HIPÓTESIS	19
1.6 ALCANCE Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	20
1.6.1 Alcances.....	20
1.6.2 Limitaciones.....	20
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	21
2.1 Babesiosis Equina	21
2.2 Agentes Etiológicos.....	21
2.3 Ciclo Biológico	22
2.4 Transmisión.....	22
2.5 Vectores	23
2.7 Manifestaciones Clínicas.....	24
2.7.1 Signos Clínicos.....	24
2.8 Diagnóstico.....	26

2.8.1 Exámenes de laboratorio	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 Materiales.....	29
3.1.1 Materiales para la extracción de sangre	29
3.1.2 Materiales para el procesamiento de PCR	29
3.2 Diseño Metodológico	29
3.2.1 Extracción de Sangre	30
3.2.2 Identificación del agente (Theileria equi) mediante la Reacción en Cadena	30
de la Polimerasa (PCR)	30
3.2.3 Identificación del agente (Theileria equi) mediante el Frotis Sanguíneo con tinción de Diff-Quick	33
3.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	35
3.2.4.1 Cálculo de la prevalencia de la población	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
4.1 Resultados obtenidos de las muestras por Edad	36
4.2 Resultados obtenidos de las muestras por Género.....	37
4.3 Resultados obtenidos a través del PCR	38
4.4 Resultados obtenidos a través del frotis sanguíneo	39
4.5 Resultados obtenidos a través del PCR vs Frotis Sanguíneo.....	40
4.6 DISCUSIÓN	42
5. CONCLUSIONES.....	46
6. RECOMENDACIONES	47
7. BIBLIOGRAFÍAS CONSULTADAS	49

1. INTRODUCCIÓN

La piroplasmosis equina es una infección en los caballos producida por protozoos y transmitida por garrapatas. Es posible que sea difícil diagnosticar la piroplasmosis, ya que puede causar signos clínicos variables y no específicos. (Cfsph(2008))

Theileria equi (*T.equi*) son protozoos parásitos intraeritrocitarios que causan la piroplasmosis equina (PE). Anteriormente *T. equi* se designaba como *Babesia equi*. Estos parásitos son transmitidos por garrapatas del género *Dermacentor*, *Hyalomma* y *Rhipicephalus*, las cuales se infectan al ingerir estos protozoos que se encuentran en la sangre de los équidos infectados. Después de la recuperación, los caballos pueden convertirse en portadores de estos parásitos por mucho tiempo y actuar como fuentes de infección para las garrapatas, que a su vez parasitarán otros caballos. (Cruz, F. Camino, E. 2017)

La PCR, utilizada para la identificación del parásito en sangre periférica de caballos infectados, es el método con mayor sensibilidad. La PCR, utilizada para la identificación del parásito en sangre periférica de caballos infectados, es el método con mayor sensibilidad. (Cruz, F. Camino, E. 2017)

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La *Theileria equi* es un parásito obligado intraeritrocitario conocido como piroplasma, que solo causa enfermedad a los équidos. La importancia de la piroplasmosis equina radica en que la mayoría de los equinos que se recuperan de la enfermedad quedan siendo portadores asintomáticos dando lugar a una fuente de infección para otros animales. (Gutiérrez, E. 2021).

La mayoría de los casos en donde se sospecha de la Piroplasmosis Equina suelen ser tratados en base a la sintomatología clínica sin recurrir a los métodos laboratoriales para así determinar específicamente la enfermedad, la especie de piroplasma implicada y luego prescribir un tratamiento específico, ya que este a su vez difiere mucho según de la especie a tratar.

1.2 ANTECEDENTES

Los Piroplasmas son miembros del Phylum Apicomplexa. Los géneros *Babesia* y *Theileria* pertenecen a la familia Piroplasmidae, por lo que el término piroplasma deriva de la similitud de la forma en que se replica este hemoparásito dentro de los eritrocitos en forma de pera. (Trujillo, 2015)

Theileria equi era considerada una pequeña *Babesia*, pero en 1998 fue descrita dentro del género *Theileria* debido a que se replica en primer lugar en linfocitos y posteriormente en eritrocitos. (Trujillo, 2015)

En 1905 Koch postuló que la fiebre biliar de los caballos estaba causada por dos patógenos, ahora conocidos como *Babesia caballi* y *Theileria equi*. Nuttall y Strickland en 1910 hicieron una clara distinción de la forma intraeritrocitaria de ambos microorganismos durante sus observaciones. (Trujillo, 2015)

De los 120 millones de caballos que hay en el mundo, el 90% viven en zonas endémicas; además de los gastos producidos por la mortalidad y coste de los tratamientos, es importante la repercusión de esta enfermedad que disminuye el rendimiento deportivo de los animales y limita el movimiento de los mismos a concursos, competiciones internacionales y Olimpiadas, así como en general las restricciones de los animales positivos que afectan negativamente al comercio internacional de équidos. (Trujillo, 2015)

Países como Venezuela, Brasil, Colombia, Puerto Rico son consideradas zonas endémicas a piroplasmosis con un gran número de équidos seropositivos a *T. equi* y *B. caballi*. (Trujillo, 2015)

En Brasil se determinó una prevalencia de un 91 % de caballos positivos a *T. equi* por medio de la prueba de PCR, este trabajo se realizó en caballos de matadero (Bolaños & Alexandra, 2012)

Theileria equi fue introducida a Australia entre los años 1950 y 1960 por la importación de caballos Cuarto de Milla procedentes de Texas, y en 1976 se importaron caballos de la raza Andaluz provenientes de España; sin embargo, el microorganismo no se

estableció en el país, y la infección a caballos nativos se dio por el uso de fómites contaminados. (Trujillo, 2015)

Theileria equi fue introducida a los Estados Unidos (EUA) en 1959 por caballos importados de Cuba.

En el 2008 y 2009, en Missouri y en Florida, EUA, se identificaron caballos portadores de T. equi, siendo asociados estos brotes a caballos importados de México involucrados en carreras ilegales; en estos casos, la transmisión de la enfermedad se realizó por el uso compartido de agujas y transfusiones sanguíneas de caballos seropositivos en hipódromos no regulados. (Trujillo, 2015)

En Guatemala, un estudio realizado con PCR determinó un 93,7% de caballos positivos a T. equi (Bolaños & Alexandra, 2012)

Por otro lado, los países que están considerados libres de piroplasmosis equina son Bélgica, República Checa, Austria y Polonia; sin embargo, animales seropositivos identificados en países europeos no endémicos han sido provenientes de países endémicos como España, Italia y Francia. Han sido reportados brotes de piroplasmosis en Alemania, Suiza y Australia debido al uso indebido de agujas e instrumental contaminado con sangre de individuos portadores, excluyendo la transmisión por garrapatas. De igual forma, se ha demostrado la presencia de équidos seropositivos a T. equi en Japón, que se consideraba una región libre de esta enfermedad. (Trujillo, 2015)

1.3 JUSTIFICACIÓN

La Piroplasmosis equina es una enfermedad de importancia sanitaria (enfermedad frecuente en caballos que presentan un proceso grave), económica (con el desarrollo del comercio internacional), y social (bajo desempeño en actividades deportivas) (Bolaños & Alexandra, 2012)

La Piroplasmosis equina supone un condicionante para el tránsito internacional de caballos deportivos.

Según la gravedad de la infección, el daño se manifiesta desde una disminución en el rendimiento físico hasta la muerte del animal. La piroplasmosis equina presenta una amplia distribución y diversas características epidemio-lógicas según la localización geográfica. Los equidos de biomas tropicales y subtropicales están constantemente expuestos al agente patógeno, desarrollando una respuesta inmune activa. (Vargas et al., 2004)

En la actualidad existen diversos métodos directos para el diagnóstico de la infección tales como el frotis sanguíneo la inoculación experimental. Sin embargo, éstos están sujetos a la experiencia y criterio del profesional que los ejecuta. Entre los métodos indirectos más usados, existen varias pruebas serológicas como, fijación del complemento, fluorescencia indirecta y ELISA. (Vargas et al., 2004)

Lo anteriormente expuesto, justifica la necesidad de una técnica que permita la identificación directa, rápida, específica y sensible, capaz de diferenciar el parásito en

los equinos. A su vez, tomando en cuenta el impacto económico, sanitario, social y de ámbito deportivo que tiene la babesiosis equina, y la disponibilidad de contar con el PCR y el método de frotis sanguíneo como herramienta de diagnóstico, el presente trabajo se propone estudiar la prevalencia de la T. equi.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo General

- Generar información científica que permita mejorar el diagnóstico de Theileria equi en equinos. Asimismo, se busca estimar de manera precisa la prevalencia de Piroplasma Equina (T. equi) en esta especie, empleando métodos diagnósticos que incluyen la técnica de amplificación de ácido nucleico conocida como PCR, así como el análisis de frotis sanguíneos. Estos enfoques combinados proporcionarán una evaluación integral y rigurosa de la presencia y distribución del agente patógeno, permitiendo un diagnóstico más completo y preciso en beneficio de la salud y el bienestar equino.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Determinar la prevalencia de Theileria equi en caballos pura sangre de carrera por medio del método diagnóstico de PCR.
- Determinar la prevalencia de Theileria equi en caballos pura sangre de carrera por medio del método diagnóstico de frotis sanguíneo.
- Determinar el grado de concordancia entre la prueba de PCR y el Frotis Sanguíneo para el diagnóstico de Theileria equi.

1.5 HIPÓTESIS

La prevalencia de *Theileria equi*, determinada mediante el método diagnóstico de PCR, es significativamente mayor que la prevalencia obtenida mediante el método diagnóstico de frotis sanguíneo.

La confirmación de esta hipótesis tendría implicaciones importantes en la elección del método diagnóstico más adecuado para la detección y monitoreo de *Theileria equi* en caballos.

1.6 ALCANCE Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

1.6.1 Alcances

- Se busca contribuir en un mejor diagnóstico utilizando un método más sensible y confiable.

1.6.2 Limitaciones

- Carencias de kit de pruebas de PCR para la detección de Piroplasmosis Equina del agente etiológico *Theilreia equi*.
- Manejo en los equipos para la realización de las muestras de PCR.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Babesiosis Equina

También es llamado Piroplasmosis Equina y Fiebre Biliar. Las especies *Babesia caballi* y *Theileria equi*, solos o combinados, son los protozoos responsables de esta enfermedad.

Son transmitidas por varias especies de garrapatas del género *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Hyalomma*. Todos los equinos incluyendo caballos, mulas, burros y cebras pueden ser afectados.

2.2 Agentes Etiológicos

Los protozoos parásitos intraeritrocitarios *Theileria equi* (*T. equi*) y *Babesia caballi* (*B. caballi*), pertenecientes al Filo Apicomplexa y al Orden Piroplasmida, son los agentes causantes de la PE, pudiendo ambos parásitos infectar a un mismo animal al mismo tiempo. Estos protozoos son comúnmente conocidos como piroplasmas debido a que adoptan una forma piriforme en el interior de los glóbulos rojos del hospedador.

Theileria equi mide aproximadamente 2 μm de largo, es basófila, pleomórfica, más comúnmente redonda, ovalada o piriforme, a veces en forma anular. Posee uno o varios merozoitos, principalmente uno o cuatro; cuando se encuentran cuatro merozoitos en un glóbulo rojo se denomina "cruz de malta".

Babesia equi fue reclasificada como *Theileria equi* en 1998. A través de varios estudios se demostró la diferencia en cuanto al ciclo de vida, proteínas superficiales y el ADN

de este parásito al de los de la familia Babesidae y la similitud con los de la familia Theileridae. (Piedrasanta & Lucía, (2009b))

2.3 Ciclo Biológico

Ausencia de transmisión vertical y la existencia de una etapa extra eritrocitaria. Una vez dentro del hospedador vertebrado, los esporozoítos invaden primero las células mononucleares de sangre periférica (CMSP: macrófagos, linfocitos y monocitos) donde ocurre la esquizogonia dando lugar inicialmente a micro y macro esquizontes y posteriormente a merozoitos. Estos últimos invaden los eritrocitos y son liberados por toda la circulación sanguínea continuando con su ciclo biológico.

2.4 Transmisión

Los caballos se infectan con *Theileria equi* cuando son parasitados por garrapatas portadoras; estas garrapatas adquieren estos protozoos al ingerir sangre, dentro de ella se dan varios ciclos de replicación; las células intestinales, los ovarios y las glándulas salivales se infectan. Se da una constante liberación de esporozoitos en el lumen de la glándula salival a través de la hemolinfa. Estos hemoparásitos responsables de la Babesiosis equina son transmitidos cuando las garrapatas, ya sean adultas o ninfas muerden a un equino, infectándolo.

El ciclo biológico de las garrapatas incluye cuatro estadios (huevo, larva, ninfa y adulto) y la transmisión de los piroplasmas equinos dentro de las garrapatas puede ocurrir de tres formas distintas: intraestadial (tanto la adquisición como la transmisión de los parásitos ocurren en un mismo estadio), transestadial o interestadial (la adquisición

tiene lugar en un estadio y la transmisión por los siguientes, estando presente el parásito durante el desarrollo de la garrapata) y transovárica (las hembras son capaces de transmitir la infección a la descendencia). *T. equi* puede transmitirse vía intra y transestadial. (Gutiérrez, E. (2021))

2.5 Vectores

Se ha descrito que la Babesiosis equina es transmitida por varias especies de garrapatas del género *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Hyalomma*. En el año 2005 Russell describe a las siguientes 8 especies de garrapatas como vectores de *Theileria equi* respectivamente:

- *Rhipicephalus sanguineus*
- *Rhipicephalus evertsi*
- *Rhipicephalus turanicus*
- *Rhipicephalus bursa*
- *Dermacentor reticularis*
- *Dermacentor marginatus*
- *Hyalomma excavatum*
- *Hyalomma anatolicum*. (Piedrasanta & Lucía, (2009b))

2.6 Patogénesis

Se conoce poco de la patogénesis de la Babesiosis equina. Cuando los eritrocitos son parasitados por *Theileria equi*, se provoca estrés metabólico de estas células. Esto

causa hipofosfatemia y debilitamiento de las membranas de los eritrocitos resultando en hemólisis.

La lisis intravascular de los eritrocitos produce hemoglobinemia, hiperbilirubinemia, ictericia, hemoglobinuria, especialmente en infecciones con *Theileria equi*.

Al haber menos eritrocitos circulando en la sangre se reduce la capacidad de ésta para oxigenar a todos los tejidos del cuerpo del animal; por esto es que la respiración y la frecuencia cardiaca aumentan.

Las células afectadas se van juntando en pequeños vasos y capilares obstruyendo el fluido normal de sangre predisponiendo a causar coagulopatía intravascular diseminada (CID). Estos acúmulos de eritrocitos, al ser filtrados, dañan el riñón pudiendo causar un fallo renal.

Debido a que el órgano encargado de remover los eritrocitos viejos, dañados o destruidos es el bazo, éste se encuentra agrandado.

Para *T. equi* el grado de parasitemia varía de 1 a 7%, siendo su máximo el 95% (Piedrasanta & Lucía, (2009b))

2.7 Manifestaciones Clínicas

En general, el periodo de incubación de la PE tras la picadura de una garrapata es de 7 a 22 días, pudiendo variar de 12 a 19 días en el caso de infecciones debidas a *T. equi*. (Gutierrez, E. (2021))

2.7.1 Signos Clínicos

Los signos clínicos de la piroplasmosis son variables y no específicos.

- **La forma hiperaguda** es la menos frecuente y en la mayoría de los casos los caballos suelen encontrarse muertos o moribundos.

Los animales afectados no van a mostrar ningún tipo de signo clínico previo, sino que tiene lugar una rápida obstrucción de los capilares por los eritrocitos parasitados derivando en enfermedad hepática y/o renal, coagulopatía intravascular y por consiguiente fallo multiorgánico y muerte del animal. (Gutiérrez, E. (2021))

- **La infección aguda** se caracteriza por:
 - Fiebre (normalmente superior a los 40°C), La fiebre es intermitente.
 - Letargia
 - Anorexia
 - Edema en extremidades
 - Petequias en membranas mucosas (tercer párpado incluido)
 - Mucosas pálidas o ictericas
 - Elevación de la frecuencia cardiaca y respiratoria
 - Hemoglobinuria y/o bilirrubinuria (Gutiérrez, E. (2021))

- **Los caballos con PE subaguda** manifiestan:
 - Fiebre transitoria y distintos grados de anorexia
 - Pérdida de peso
 - Edema periférico
 - Taquicardia, taquipnea y disminución del rendimiento. (Gutiérrez, E. (2021))

- **Los caballos infectados crónicamente** presentan:
 - Signos clínicos no específicos.
 - Ligera inapetencia, pérdida de peso, baja tolerancia al ejercicio, condición corporal deficiente y malestar.
 - No suelen manifestarse signos de anemia y si se manifiestan suelen ser muy leves. Sin embargo, la esplenomegalia es muy frecuente. (Gutiérrez, E. (2021))

2.8 Diagnóstico

2.8.1 Exámenes de laboratorio

2.8.1.1 Método Directo

Identificación del agente mediante microscopía

Comúnmente se realiza a través de frotis de sangre periférica, fijados con metanol y tinciones comúnmente con Giemsa. El hallazgo de los protozoos depende de la fase parasitaria en la que se encuentre y de la cantidad de eritrocitos infectados. En la observación al microscopio *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 asintomáticos. (Gutiérrez, L. Carrillo, K. (2019))

Identificación del agente mediante la Reacción en Cadena de la 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 garrapatas. (Gutiérrez, L. Carrillo, K. (2019))

2.8.1.2. Método Indirecto

Detección de la respuesta inmune mediante Inmunoensayo Competitivo Ligado a Enzimas (cELISA)

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 kit. (Gutiérrez, L. Carrillo, K. (2019))

Detección de la respuesta inmune mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Es una técnica aceptada por el Código Zoonosario 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 cuantificación. (Gutiérrez, L. Carrillo, K. (2019))

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Materiales para la extracción de sangre

- Tubos de tapa morada (EDTA), Marcador con punta extrafina para la identificación de los tubos, alcohol regular, algodón, Jeringas de 5ml, cooler, empaquetes de bolsas de hielos refrigerantes.

3.1.2 Materiales para el procesamiento de PCR

- Pipetas de 50 ul y 1000ul, puntas con filtro para pipetas de 1-50 ul y 100-1000 ul, tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, gradillas, Etanol 95% (grado molecular), Centrífuga (mini cubee), Equipo Pockit, PetNad (kit de extracción), Kits completos de iiPCR,(Theillera equi) guantes sin polvo de nitrilo, papel toalla, muestra de sangre entera.

3.1.3 Materiales para el procesamiento de frotis sanguíneo

- Jeringas de 1 ml, portaobjeto, muestra de sangre entera, diff-quick, microscopio y aceite de inmersión.

3.2 Diseño Metodológico

Se realizo el estudio en el Hipódromo Presidente Remón Cantera. Utilizando 40 caballos, previamente registrados, en donde se tomo en cuenta los aquellos caballos que presentaban sintomatología sugestiva de Piroplasmosis Equina.

Luego se procedió a la toma de muestra de sangre para realizar posteriormente tanto pruebas de PCR como frotis sanguíneos con tinción de diff-quick.

3.2.1 Extracción de Sangre

La toma de muestra se realizó en la vena yugular, con el caballo previamente sujetado, La sangre se obtiene de la vena yugular, situada en la gotera de la yugular, la punción se localiza entre el primer y segundo tercio del cuello. Para ello se presiona la base del cuello para ingurgitar la yugular y se procede a introducir la aguja con un ángulo de 45° respecto a la vena. (Pizzarello, S. 2013)

3.2.2 Identificación del agente (*Theileria equi*) mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El ensayo se basa en iPCR para la detección cualitativa de *Theileria equi*.

La química de hidrólisis de la sonda fluorogénica se utiliza para generar una señal fluorescente cuando se amplifica una secuencia de ácido nucleico específica de *T. equi*. Los cebadores y las sondas se dirigen al gen del antígeno 1 del merozoito equino de *Theileria equi*, y no reaccionan con el ADN genómico y los ácidos nucleicos del huésped de otros patógenos.

El procedimiento de amplificación de ácido nucleico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo siguiendo un protocolo estándar y riguroso. A continuación, se describe de manera detallada cada etapa del proceso:

- **Uso del kit de preparación conjunta de ácidos nucleicos PetNAD**

1. Se añadió 200 ul de sangre entera en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml con 600 ul de PB1.
2. Se mezcló bien durante 1 minuto.
3. Se añadió 600 ul PB2 (con etanol) en el tubo.
4. Se mezcló bien durante 10 segundos.
5. Se colocó la columna de centrifugación a un tubo de recogida.
6. Se transfirió 600 ul de la mezcla al conjunto de la columna y el tubo de recogida.
7. Se centrifugó por 1 minuto y desechó el flujo a través de recogida de y se volvió a montar el tubo de recogida en la columna de centrifugación.
8. Se añadió 600 ul PB3 (con etanol) en la columna y tubo de recogida.
9. Se centrifugó por 1 minuto y desechó el flujo.
10. Se añadió 600 ul PB4 (con etanol) en la columna y tubo de recogida.
11. Se centrifugó por 1 minuto y desechó el flujo continuo.
12. Se centrifugó por otros 3 minutos para remover el residuo del etanol.
13. Se transfirió la columna de centrifugación a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml.
14. Se añadió 200 ul PB5 en la columna de centrifugación. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto.
15. Se Centrifugó por 1 minuto para eluir los ácidos nucleicos en el tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
16. Se desechó la columna de centrifugación y proceda al análisis de iPCR del extracto de ácido nucleico dentro de 1 hora.

- **Uso POCKIT™ Set de reactivos de Theileria equi**

Nota: Antes de preparar las reacciones para las pruebas de iPCR se enciende el POCKIT™ Analizador de Ácidos Nucleicos para iniciar la calibración del instrumento. El dispositivo completa su autocomprobación en 5 minutos.

1. Se etiqueta el tubo R en el área de etiquetado.
2. Se prepara una premezcla para cada muestra. (los tubos de premezcla están en el paquete de premezcla, cada paquete de premezcla contiene 8 tubos premezcla.)

Nota: Cuando el pellet no se encuentra en la parte inferior del tubo, centrifugar brevemente el tubo para bajarla.

3. Se añadió 50 ul Tampón de premezcla para cada tubo de premezcla.
4. Se añadió 5 ul del extracto de ácido nucleico o Control P (+) disuelto a cada tubo de premezcla. Mezclar cada tubo de premezcla en una minicentrífuga (como cubee™ Mini-Centrífuga).
5. Se transfiere 50 ul Premezcla/muestra al tubo R.
6. Sellar la parte superior de cada tubo R-tubo con un tapón. Asegurese que el tubo R se tape herméticamente.
7. Se colocó el tubo R en el soporte de POCKIT™ Analizador de Ácido Nucleico.
8. Centrifugar brevemente en el cubee™ Mini-Centrífuga para asegurarse de que toda la solución se encuentre en la parte inferior del tubo R.

Nota: Asegúrese de que no hay burbujas en la solución.

Nota: Iniciar la reacción dentro de 1 hora para reducir la degradación del ácido nucleico y una reacción no específica.

- **POCKIT™ Reacción Ácido Nucleico:**

- a. Seleccionar "520 nm".
- b. Cuando se muestra "System Ready", se coloca el soporte con el tubo R en la cámara de reacción.
- c. Se toca cada tubo R-para asegurarse que el tubo esté posicionado correctamente.
- d. Se cierra la tapa y pulse "Run" para iniciar el programa de la reacción.
- e. Los resultados del ensayo se muestran en el monitor después de la reacción se complete.

3.2.3 Identificación del agente (*Theileria equi*) mediante el Frotis Sanguíneo con tinción de Diff-Quick

Con la ayuda de una jeringa de 1 ml, se extrae una muestra de sangre del tubo de recolección previamente homogeneizado mediante un ligero movimiento. A continuación, se depositó una gota de sangre en el extremo proximal del portaobjeto inclinado a 45 grados, en su parte central, lo que genera una línea vertical a lo largo del portaobjeto. Luego, utilizando otro portaobjeto estéril, se realiza un contacto firme en un ángulo de 45 grados sobre la superficie donde se deposita la sangre, permitiendo que esta se expanda y forme una capa delgada y homogénea.

La muestra de sangre extendida en el portaobjeto se deja secar a temperatura ambiente durante uno o dos minutos, y posteriormente se procede a realizar la coloración utilizando la tinción de Diff-Quick, con el objetivo de facilitar la observación del agente etiológico. (Sánchez, A. Arias, L. Perera, R. González, B. 2020)

Se utilizará la tinción de Diff-Quick se trata de una tinción de tres reactivos:

- Fijador, que es un tipo de alcohol.
- Colorante ácido: eosina. Tiñe partes básicas como el citoplasma.
- Colorante básico: azul de metileno. Tiñe partes ácidas como el núcleo.

Se debe seguir un protocolo de tinción siempre. Además, hay que llevar un control de cuidado en los tintes: se deben filtrar para retirar los precipitados. Los botes se deben cerrar siempre para evitar la evaporación, especialmente del fijador. (Ifevet Streaming Auxiliares, 2021)

Los pasos básicos para realizar un frotis sanguíneo con la tinción Diff-Quik:

1. Preparación de la Muestra:

- Se colocó una gota de sangre fresca en un extremo de un portaobjetos de vidrio limpio y seco.

2. Extensión del Frotis:

- Se uso otro portaobjetos de vidrio para extender la sangre desde el extremo donde colocaste la gota hasta el otro extremo del portaobjetos.
- La extensión debe ser uniforme, creando un frotis delgado y homogéneo.

3. Secado:

- Se dejó secar el frotis al aire por unos minutos. No se utilizó calor externo, ya que podría afectar la calidad de las células.

4. Fijación:

- Se sujetó el portaobjetos por el extremo no manchado y se sumergió rápidamente en el fijador Diff-Quik durante 10-15 segundos.

5. Tinción:

- Se sumergió el portaobjetos en el colorante ácido durante 5-10 segundos.
- Se lavó el portaobjetos en agua corriente.

6. Contraintinción:

- Se sumergió el portaobjetos en el colorante básico durante 5-10 segundos.
- Se lavó el portaobjetos nuevamente en agua corriente.

7. Secado Final:

- Deja secar completamente el portaobjetos al aire.

Por último, se procedió a la observación microscópica de los frotis realizados.

3.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

La evaluación estadística de los datos se realizó mediante tablas utilizando el programa Microsoft Excel de Windows. El análisis comenzó con una estadística descriptiva, donde los valores de las variables del PCR y del frotis sanguíneo se expresaron en términos numéricos. Estos valores se calcularon en porcentajes, diferenciando positivos de negativos, para ofrecer una visión integral y cuantitativa de la presencia de *Theileria equi* en la muestra estudiada. Este enfoque estadístico proporciona una base sólida para comprender la distribución y prevalencia de *Theileria equi*, fundamentando de manera rigurosa las conclusiones derivadas del estudio.

3.2.4.1 Cálculo de la prevalencia de la población

En este caso, se tuvo 1 caso positivo en una población de 40 caballos, la prevalencia sería:

$$\text{Prevalencia} = (1/40) \times 100$$

$$\text{Prevalencia} = 2.5\%$$

Por lo tanto, la prevalencia de la piroplasmosis de Theileria equi en este ejemplo sería del 2.5%.

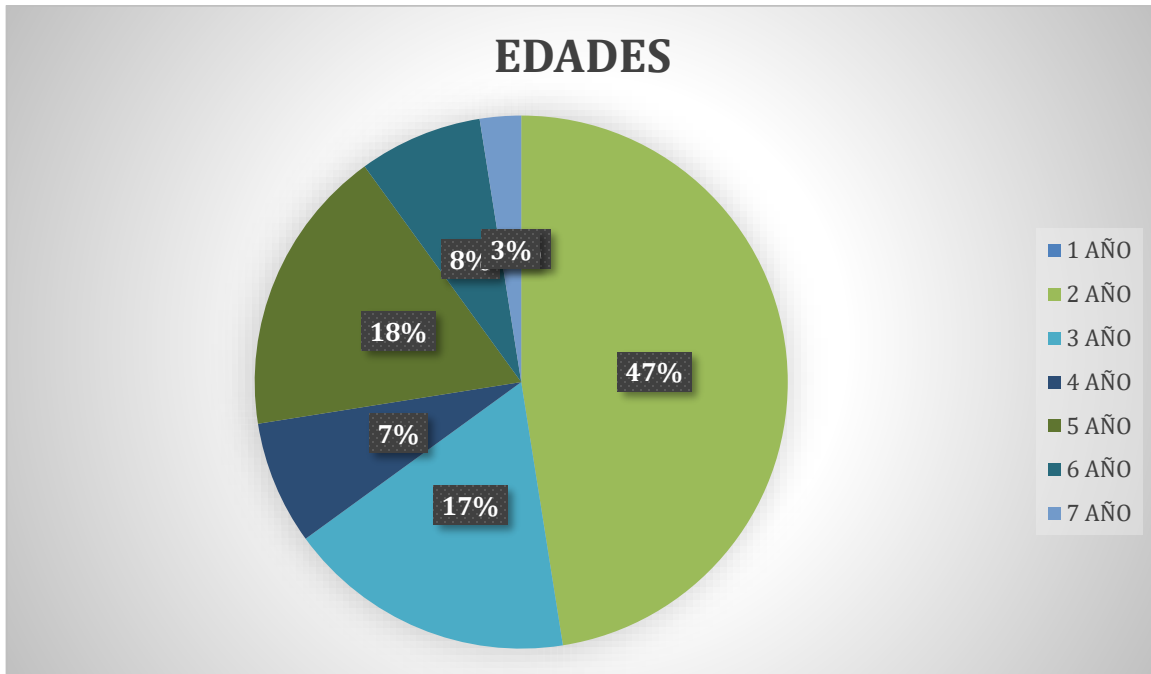
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados obtenidos de las muestras por Edad

Se llevó a cabo un muestreo específico por edades en una población de 40 caballos, evidenciando que el 47% de los equinos en el estudio tenían 2 años, mientras que solo un 3% correspondía a caballos de 7 años.

Resultados obtenidos de las muestras por Edad		
Edad (Año)	#	%
1 Año	0	0%
2 Año	19	47%
3 Año	7	17%
4 Año	3	7%
5 Año	7	18%
6 Año	3	8%
7 Año	1	3%
Total	40	100%

Tabla 1: Porcentaje Resultados obtenidos de las muestras por Edad1



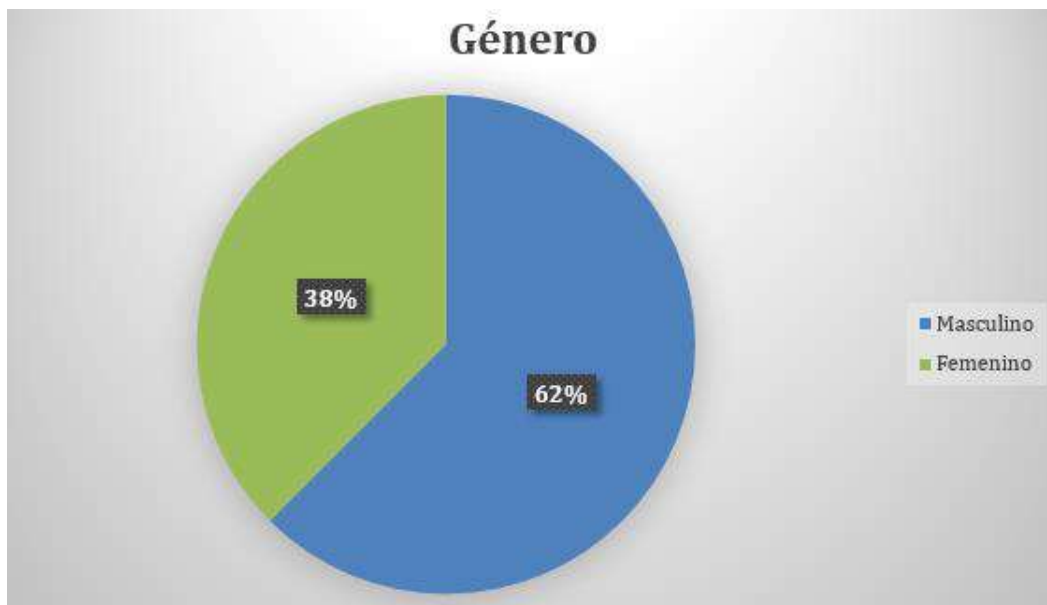
Gráfica 1: Representación gráfica de los valores en porcentaje de los Resultados obtenidos de las muestras por Edades

4.2 Resultados obtenidos de las muestras por Género

Se llevó a cabo un muestreo específico por género en una población de 40 caballos con el fin de identificar las proporciones de hembras y machos. Los resultados muestran que el 38% de los caballos en el estudio fueron hembras, mientras que el 62% fueron machos.

Resultados	#	%
Hembras	15	38%
Machos	25	62%
Total	40	100%

Tabla 2: Porcentaje de Resultados obtenidos de las muestras por Género



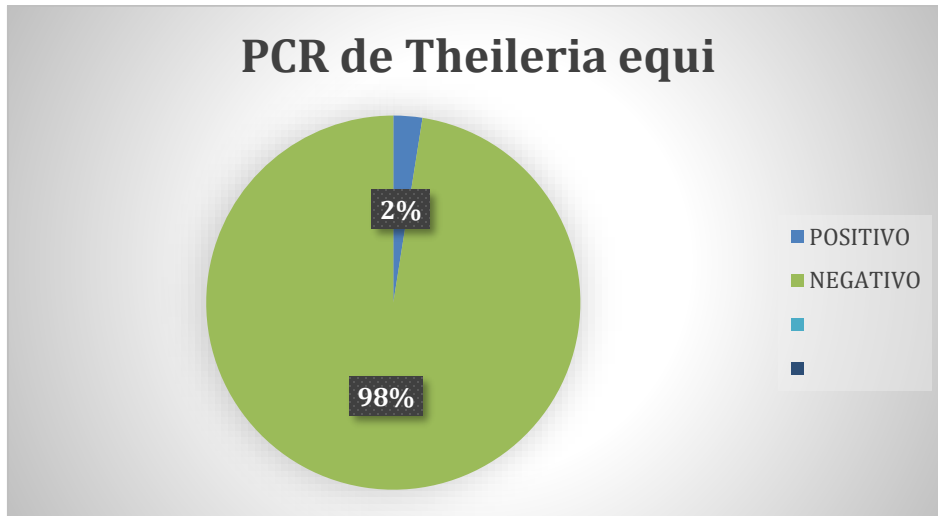
Gráfica 2: Representación gráfica de los valores en porcentaje de los Resultados obtenidos de las muestras por Género

4.3 Resultados obtenidos a través del PCR

Se realizó una prueba específica para detectar *Theileria* en una población de 40 caballos, revelando un resultado positivo en uno de los animales y negativo en los 39 restantes.

Resultados obtenidos a través del PCR		
Theileria equi		
Resultados	#	%
Positivos	1	2%
Negativos	39	98 %
Total	40	100%

Tabla 3: Porcentajes de resultados positivos vs negativos a través del PCR



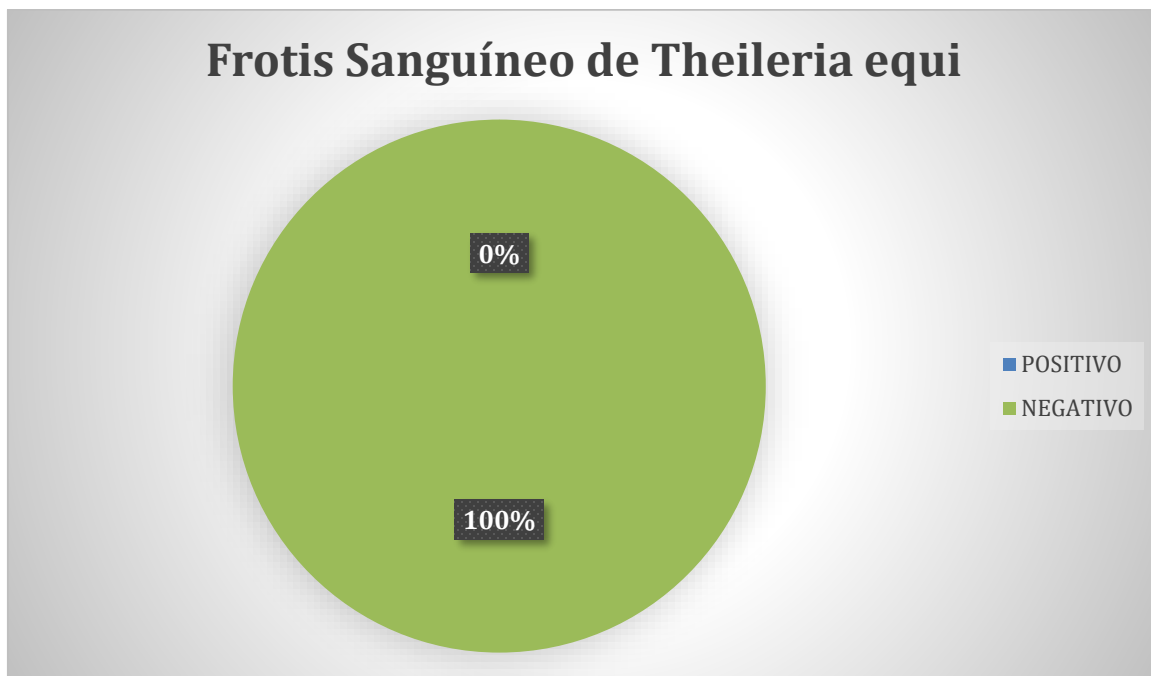
Gráfica 3: Representación gráfica de los valores en porcentaje de los caballos positivos vs negativos a través del PCR

4.4 Resultados obtenidos a través del frotis sanguíneo

Se llevó a cabo una prueba específica para detectar Theileria en una población de 40 caballos, mostrando resultados negativos en todos los casos, sin ningún positivo registrado.

Resultados obtenidos a través del Frotis sanguíneo		
Resultados	#	%
Positivos	0	0%
Negativos	40	100%
Total	40	100%

Tabla 4: Porcentajes de resultados positivos vs negativos a través del frotis sanguíneo



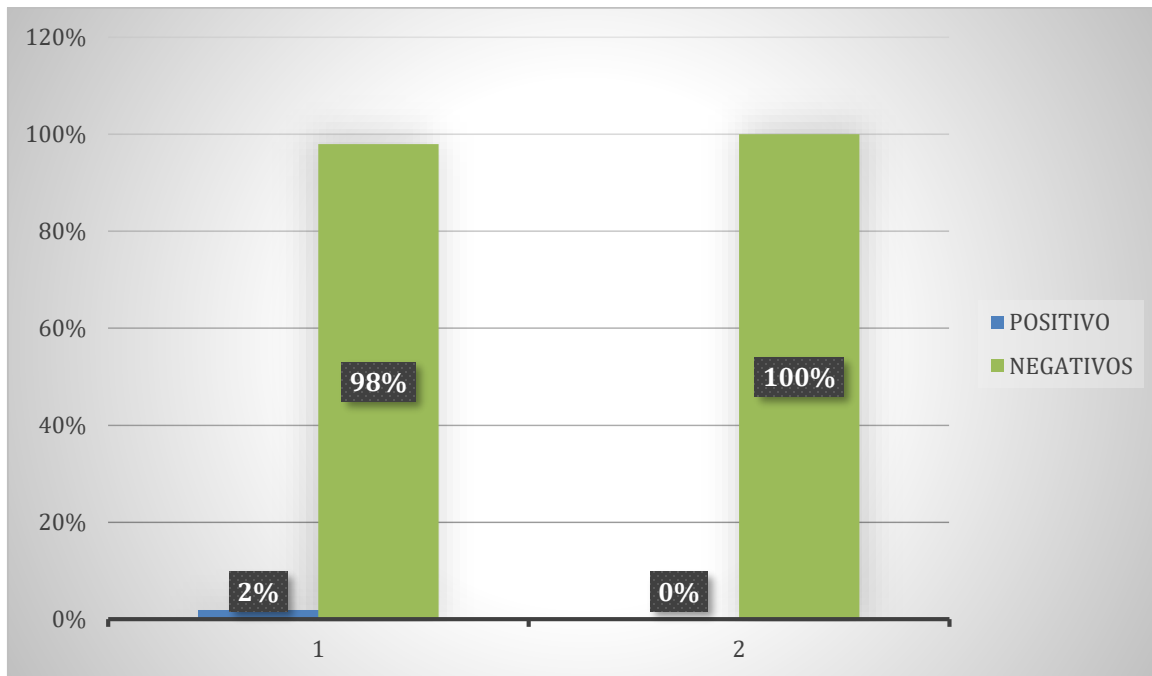
Gráfica 4: Representación gráfica de los valores en porcentaje de los caballos positivos vs negativos a través del frotis sanguíneo

4.5 Resultados obtenidos a través del PCR vs Frotis Sanguíneo

Se realizó una prueba específica para detectar Theileria en una población de 40 caballos, evidenciando resultados negativos en todos los casos mediante frotis sanguíneo. Sin embargo, al aplicar la prueba de PCR, se obtuvo un resultado de 39 caballos negativos y 1 caso positivo.

Resultados	PCR (1)	%	Frotis Sanguíneo (2)	%
Positivos	1	2%	0	0%
Negativos	39	98%	40	100%
Total	40	100%	40	100%

Tabla 5: Porcentajes de resultados obtenidos del PCR vs Frotis Sanguíneo



Grafica 5: Representación gráfica de los valores en porcentaje de los resultados obtenidos del PCR vs Frotis Sanguíneos

4.6 DISCUSIÓN

La investigación sobre la prevalencia de la Piroplasmosis equina en el Hipódromo Presidente Remón Cantera revela una interesante combinación de resultados al emplear las técnicas de PCR y frotis sanguíneo como métodos diagnósticos.

La Piroplasmosis equina, causada por el protozoo hemoparásito *Theileria equi*, es una enfermedad importante en equinos. Dicha infección se transmite principalmente por garrapatas del género *Rhipicephalus*, que actúan como vectores.

Desde una perspectiva epidemiológica, la distribución de *Theileria equi* está relacionada con la presencia de garrapatas y las condiciones climáticas favorables para su propagación. Estudios han destacado la importancia de entender los factores ambientales y geográficos que influyen en la prevalencia de la enfermedad.

El diagnóstico de *Theileria equi* ha evolucionado con la introducción de técnicas más sensibles y específicas, incluyendo la microscopía, pruebas serológicas y moleculares. La elección del método de diagnóstico puede depender de la etapa de la infección y la disponibilidad de recursos, subrayando la necesidad de enfoques integrales. (Y. Tamzali, 2013)

En primer lugar, la aplicación de la prueba de PCR reveló un resultado positivo en uno de los 40 caballos evaluados. Este hallazgo indica la presencia de *Theileria equi* en al menos el 2.5% de la población estudiada. La sensibilidad y especificidad de la PCR

hacen de este método una herramienta eficaz para la identificación precisa del agente etiológico. Sin embargo, la baja prevalencia detectada sugiere una posible baja incidencia de la infección en la población del Hipódromo.

La PCR permite la detección del ADN del parásito. También se ha demostrado en muchos estudios que es más sensible que los frotis de sangre para el diagnóstico de infecciones inaparentes (Y. Tamzali, 2013).

Contrastando con estos resultados, la prueba de frotis sanguíneo no reveló ningún caso positivo. Este método, aunque ampliamente utilizado, puede presentar limitaciones en términos de sensibilidad, especialmente en casos de baja parasitemia o infecciones crónicas. La falta de positivos en el frotis sanguíneo podría indicar que la carga parasitaria en la población es baja o que el método podría no ser tan sensible como la PCR.

El Frotis de sangre es un importante examen microscópico cuidadoso de los frotis de sangre teñidos con Giemsa, Wright o Diff-Quick porque el nivel de parasitemia pueden ser muy bajos incluso en casos agudos. En T. equi las infecciones por lo general oscila entre el 1% y el 7%, pero puede exceder el 20% (Rothschild y Knowles 2007; Donnellan y Marais 2009) y alcanzar el 80% en casos graves (Friedhoff et al. 1990).

Los parásitos aparecen con un citoplasma teñido de azul pálido que contiene cromatina teñida de rojo y una vacuola central. En T. equi los trofozoítos son organismos predominantemente ovalados de hasta 3 micrómetros. En T. equi los

merozoitos suelen presentarse como 4 parásitos piriformes, 1,5 micrómetro de largo, en una característica formación de cruz de Malta (Y. Tamzali, 2013).

En los portadores crónicos o no aparentes, el examen del frotis de sangre puede no ser útil porque el nivel de parasitemia puede ser muy bajo.

Dada la dificultad en la detección sanguínea de los parásitos, se han desarrollado métodos serológicos para el diagnóstico.

En el tercer escenario, donde el frotis sanguíneo mostró resultados negativos, pero la PCR reveló un caso positivo, surge la interrogante sobre la sensibilidad de las pruebas convencionales frente a las técnicas moleculares más avanzadas. Este resultado puede indicar la presencia de una carga parasitaria baja que no fue evidente en el frotis sanguíneo pero que fue detectada por la PCR, subrayando la utilidad de las técnicas de biología molecular para la detección temprana de patógenos en situaciones de baja carga parasitaria.

La determinación de la prevalencia de Piroplasmosis equina en el Hipódromo Presidente Remón Cantera mediante PCR y frotis sanguíneo resalta la utilidad de combinar múltiples enfoques diagnósticos. La baja prevalencia general detectada sugiere una situación relativamente controlada, pero la identificación de un caso positivo por PCR subraya la importancia de mantener una vigilancia continua para prevenir la propagación y garantizar la salud equina en la clínica veterinaria APROTURF del Hipódromo Presidente Remón Cantera.

Con este estudio realizado podemos afirmar que la prueba de PCR es más específica para la detección y el diagnóstico de theileria equi, con este estudio podremos brindar mayor información a los Médicos Veterinarios sobre la eficacia del PCR y frotis sanguíneo.

5. CONCLUSIONES

- Los resultados revelaron que la prueba de frotis sanguíneo no identificó ningún caso positivo, pero el PCR mostró un resultado positivo en uno de los 40 caballos evaluados.
- La prevalencia general de Piroplasmosis Equina en la población estudiada se encontró relativamente baja, con solo un caso positivo detectado mediante PCR, esto pudiendo indicar que la infección puede no ser endémica en el hipódromo, la presencia de al menos un caso sugiere que la enfermedad aún puede representar un riesgo.
- La combinación de la PCR y el frotis sanguíneo resalta la importancia de la complementariedad de los métodos diagnósticos, esta diferencia destaca la importancia de utilizar múltiples enfoques diagnósticos para obtener una imagen más precisa y completa de la situación epidemiológica.
- Los resultados obtenidos a través de esta investigación brindan una visión integral de la prevalencia de Theileria equi en el Hipódromo Presidente Remón Cantera, apuntando hacia la importancia de estrategias de diagnóstico y control efectivas para salvaguardar la salud de los caballos en este entorno específico.

6. RECOMENDACIONES

Basado en los hallazgos de este estudio, se derivan las siguientes recomendaciones para fortalecer las prácticas de diagnóstico y gestión de la Piroplasmosis Equina en el Hipódromo Presidente Remón Cantera:

- **Implementación de Programas de Monitoreo Continuo:** Dada la detección de un caso positivo mediante PCR, se recomienda establecer programas regulares de monitoreo que incluyan pruebas de PCR para identificar posibles portadores asintomáticos. Este enfoque permitirá una intervención temprana y efectiva.
- **Refuerzo de Medidas Preventivas:** A raíz del caso positivo identificado, se insta a fortalecer las medidas preventivas, como el control de vectores, manejo adecuado de desechos y prácticas de bioseguridad. Esto ayudará a prevenir la propagación de la piroplasmosis equina en el entorno del hipódromo.
- **Capacitación del Personal Veterinario:** Es crucial capacitar al personal veterinario en la interpretación de resultados de PCR y frotis sanguíneo. Esto facilitará una respuesta rápida y precisa ante resultados positivos, garantizando la implementación adecuada de medidas de control y tratamiento.
- **Revisión de Estrategias de Diagnóstico:** La discrepancia entre los resultados de PCR y frotis sanguíneo sugiere la necesidad de revisar y ajustar las estrategias de diagnóstico. Se sugiere considerar la posibilidad de utilizar métodos adicionales o combinados para mejorar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico.

- Establecimiento de Registros Epidemiológicos: Se recomienda mantener registros epidemiológicos detallados para cada caballo en el hipódromo. Esto facilitará un seguimiento continuo de la salud equina, permitiendo identificar patrones y responder proactivamente a cambios en la prevalencia de enfermedades.
- Colaboración con Instituciones Veterinarias: Fomentar la colaboración con instituciones veterinarias externas para compartir información y experiencias. Esto permitirá acceder a recursos adicionales y conocimientos especializados que contribuyan a mejorar las prácticas de manejo y diagnóstico.

7. BIBLIOGRAFÍAS CONSULTADAS

- Bartolomé Del Pino, L, E. (2017). Situación epidemiológica y clínica de la piroplasmosis equina en áreas endémicas como la península itálica e ibérica. tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Departamento de Sanidad Animal. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/45711/1/T39447.pdf>
- Bolaños, V., & Alexandra, C. (2012). Seroprevalencia de Piroplasmosis equina en caballos mantenidos en cuadra y caballos destinados a matadero en Costa Rica. <https://repositorio.una.ac.cr/handle/11056/12955>
- Cfsph(2008) Piroplasmosis Equina. The center for food security & public health https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/piroplasmosis_equina.pdf
- Cruz, F. Camino, E. (2017). Piroplasmosis equina. Revista VISAVET Divulgación. <https://www.visavet.es/es/articulos/piroplasmosis-equina.php>
- Gutiérrez, L. Carrillo, K. (2019). Diagnóstico de Theileria equi y Babesia caballi en equinos y mulares del municipio de Quetame, Cundinamarca (Colombia). <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/3634/DIAGNÓSTICO%20DE%20Theileria%20equi%20Y%20Babesia%20caballi%20EN%20EQUINOS%20Y%20MULARES%20DEL%20MUNICIPIO%20QUETAME%20C%20CUNDINAMARC-3-90.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gutiérrez, E. (2021). Estrategias para la prevención y el control de Theileria equi y Babesia caballi en la población de équidos de España. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid Facultad de Veterinaria

<https://eprints.ucm.es/id/eprint/73044/1/T43275.pdf>

- Ifevet Streaming Auxiliares. (2021). El frotis sanguíneo: preparación, identificación y recuento celular. Ifevet Streaming Auxiliares. <https://aux.streaming.ifevet.com/el-frotis-sanguineo-preparacion-identificacion-y-recuento-celular/>

- Piedrasanta & Lucía. (2009). Concordancia entre la Prueba de cElisa y el Frotis Sanguíneo como Método Diagnóstico para Babesiosis Equina (*Babesia caballi* y *Theileria equi*). Tesis Presentada a la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

<https://core.ac.uk/download/pdf/35293761.pdf>

- Sánchez, A. Arias, L. Perera, R. González, B. (2020). Piroplasmosis equina. Revista de Salud Animal, 42(1) http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2020000100002&lng=es&tlng=es

- Tamzali, Y (2013). Equine piroplasmosis: an update review

https://www.researchgate.net/publication/257243342_Equine_Piroplasmosis

- Trujillo, M, A. (2015). Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a piroplasmosis en équidos de tres regiones en el estado de Veracruz, México. tesis propuesta al colegio de profesores del posgrado de la facultad de medicina veterinaria y zootecnia de la universidad veracruzana.

<https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/39902/AlvaTrujilloMiriam.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

- Vargas, D., Bonet, R. C., Oliva, P., & Campano, S. (2004). Implementación de la técnica de PCR en la identificación de Babesia spp en equinos. *Parasitología latinoamericana*, 59(3-4). <https://doi.org/10.4067/s0717-77122004000300017>