



Determinación de la presencia de hemotrópicos en equinos provenientes de dos provincias del Ecuador, mediante la aplicación de técnicas de biología molecular (PCR)

Quillupangui Quinga, Ana Belén

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga

Chávez Larrea, María Augusta M.Sc., Ph.D. (c)

07 de abril de 2023

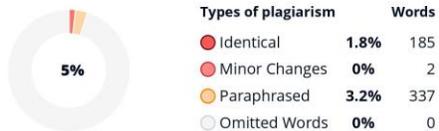


Trabajo de integracion curricular Bel...

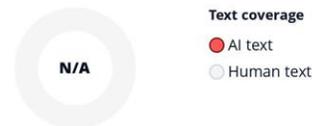
Scan details

Scan time: August 31th, 2023 at 13:58 UTC Total Pages: 42 Total Words: 10428

Plagiarism Detection



AI Content Detection



🔍 Plagiarism Results: (20)

🌐 [2017000001667.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/15018/2...) 1.7%

Caracterización clínico-laboratorial de la infección por Theileria equi en el caballo Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Centro ...

🌐 [Materiales y Métodos - Yugcha Díaz, Erika Michelle. ...](https://1library.co/article/materiales-m%c3%a9todos-yugcha...) 1.3%

...

🌐 [INTRODUCCIÓN](https://repositorio.una.ac.cr/bitstream/handle/11056/12955/...) 0.7%

...

Cinthy Vega

Universidad Nacional Facultad de Ciencias de la Salud Escuela de Medicina Veterinaria Seroprevalencia de Piroplasmosis equina en caballo...



Certified by
Copyleaks

About this report
help.copyleaks.com

copyleaks.com
in f @ t



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Determinación de la presencia de hemotrópicos en equinos provenientes de dos provincias del Ecuador, mediante la aplicación de técnicas de biología molecular (PCR)”** fue realizado la señorita **Quillupangui Quinga, Ana Belén**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 05 de octubre de 2023



Chávez Larrea, María Augusta, M. Sc.

C.C.: 0201274842



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Quillupangui Quinga Ana Belén**, con cédula de ciudadanía N° 1726349267, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Determinación de la presencia de hemotrópicos en equinos provenientes de dos provincias del Ecuador, mediante la aplicación de técnicas de biología molecular (PCR)”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 02 de octubre de 2023

Quillupangui Quinga, Ana Belén.

C.C.: 1726349267



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de publicación

Yo **Ana Belén Quillupangui Quinga**, con cédula de ciudadanía n° 1726349267, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Determinación de la presencia de hemotrópicos en equinos provenientes de dos provincias del Ecuador, mediante la aplicación de técnicas de biología molecular (PCR)”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad

Sangolquí, 03 de octubre de 2023

Quillupangui Quinga, Ana Belén

C.C.: 1726349267

Dedicatoria

El resultado de este trabajo se lo dedicó a mi familia, especialmente a mis padres Fanny y Homero, que siempre me han apoyado. A mis amigos y amigas que siempre han hecho de mis días más divertidos y a todas las personas que me incentivan diariamente para no rendirme

Agradecimientos

A mis padres por ser siempre una fuente de apoyo y a mi familia por el cariño que me han brindado durante todos mis años de formación profesional

A Jonathan Montaluisa por tratar siempre de ser un apoyo y darme grandes enseñanzas

A mis compañeros del laboratorio con quienes nos apoyábamos en cada etapa durante nuestra estadía en el laboratorio

A mis todos mis amigos que me han visto crecer durante todo este tiempo y siempre han sabido acompañarme

A la Academia de Investigación y Enseñanza Superior (ARES) y la Universidad de Lieja, Bélgica por el financiamiento, recursos y guía brindada en este trabajo.

A la Dr. María Augusta Chávez, al Dr. Jorge Ron por ser mis mentores de investigación, por la ayuda, las enseñanzas y el apoyo brindados.

A la Ing. Cristina Cholota, por su paciencia, su tiempo y las enseñanzas a lo largo de la realización de la parte experimental de este trabajo

Índice de contenido

Certificación	3
Responsabilidad	4
Autorización	5
Responsabilidad de autoría	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Abreviaturas	13
Resumen	14
Abstract	15
Capítulo I: Introducción	16
Formulación del problema	16
Justificación del problema	18
Objetivos	20
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
Hipótesis	21
Capítulo II: Marco teórico	22
Piroplasmosis Equina	22
Definición	22
Origen	22

Ciclo de vida	24
Transmisión	26
Síntomas.....	29
Distribución en América del Sur	30
Diagnóstico.....	32
Capítulo III: Materiales y métodos	35
Participantes.....	35
Zona de estudio.....	35
Duración de la investigación	36
Obtención de las muestras de estudio	36
Unidades de estudio.....	36
Trabajo de laboratorio	36
Extracción de ADN de Sangre Total mediante Kit.....	36
Integridad y cuantificación de ADN.....	37
PCR punto final para la identificación de piroplasmosis equina.	37
Electroforesis para los productos de PCR	38
Purificación de productos de PCR	39
Corte con enzimas de restricción Alul y HpaII.	39
Manejo estadístico de los datos.....	40
Capítulo IV: Resultados	41

Integridad y cuantificación del ADN extraído de sangre entera equina mediante kit comercial	41
Diagnostico por PCR de <i>T.equi</i> y <i>B.caballi</i>	42
Prevalencia de PE de acuerdo a las variables analizadas	45
Determinación de los Factores de Riesgo para PE.	46
Prueba de Chi-cuadrado para determinar la relación entre variables	46
Determinación del riesgo relativo y el riesgo atribuible	48
Capítulo V: Discusión	49
Capítulo VI: Conclusiones	52
Capítulo VII: Recomendaciones	54
Bibliografía	55

Índice de tablas

Tabla 1 Componentes de la mezcla para la reacción de PCR para PE	38
Tabla 2 Modelo de tabla para el cálculo del riesgo relativo y el atribuible para todas las variables con una diferencia significativa ($p < 0.05$).....	40
Tabla 3 Prevalencia de PE de los équido estudiados.	45
Tabla 4 Cálculo del Chi cuadrado para las variables estudiadas.	47
Tabla 5 Análisis del riesgo relativo y el riesgo atribuible.....	48

Índice de figuras

Figura 1 <i>Observación de sangre con T.equi (A) y B.caballi (B) en eritrocitos.....</i>	23
Figura 2 <i>Ciclo de vida de T. equi y B.caballi durante la infección en el equino y la garrapata vector.</i>	25
Figura 3 <i>Modelo de transmisión de T.equi y B.caballi</i>	28
Figura 4 <i>Integridad del ADN obtenido a partir de sangre entera de caballo.</i>	42
Figura 5 <i>Resultados de la PCR con los cebadores piro A y Piro B con muestras positivas para T.equi.....</i>	43
Figura 6 <i>Resultados de la PCR punto final con los cebadores piro A y piro B, con muestras positivas para B.caballi.....</i>	43
Figura 7 <i>Cortes con enzimas de restricción.....</i>	44

Abreviaturas

PE	Piroplasmosis equina
cELISA	Ensayo Competitivo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
CFT	Ensayo de fijación del complemento
PCR	Prueba de la reacción en cadena de la polimerasa
OMSA	Organización Mundial de Sanidad Animal
PBS	Tampón fosfato salino
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
EMA 1	Equine merozoite antigen 1
EMA 2	Equine merozoite antigen 2
RAP-1	Rhoptry-associated protein complex gene
iELISA	Ensayo indirecto por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
HRP	Peroxidasa rojiza del Caballo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
BC48	Proteína rhoptry de 48 kDa
OD	Densidad óptica
RR	Riesgo relativo
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

Resumen

La piroplasmosis equina es una enfermedad endémica en zonas tropicales producida por dos especies diferentes de hemoparásitos *Theileria equi* y *Babesia caballi* que son transmitidos principalmente por garrapatas a caballos, burros y mulas, y tiene consecuencias negativas a nivel económico para la industria equina debido a la reducción del rendimiento, la mortalidad y las restricciones comerciales en zonas consideradas endémicas. Los métodos rápidos de detección no suelen lograr con éxito un diagnóstico de la enfermedad en niveles bajos de parasitemia por lo que en este trabajo se aplicó una prueba de reacción en cadena de la polimerasa con los cebadores piro A y piro B para un diagnóstico más sensible. Se realizó la extracción de ácido desoxirribonucleico de las muestras de sangre de los équidos y luego se amplificó el gen ARN ribosomal 18S de los hemoparásitos con tamaños teóricos de 423 y 396 pares de bases para *Theileria equi* y *Babesia caballi*, respectivamente. Con los resultados positivos se calculó la prevalencia de la piroplasmosis equina y los factores de riesgo a partir del análisis estadístico de la chi-cuadrado. El estudio permitió determinar una prevalencia del 34,83% de la enfermedad del total de la población muestreada, siendo la provincia de Manabí, la que presentó una mayor incidencia comparada con la provincia de Imbabura. Los principales factores de riesgo que se logró establecer fueron la ubicación del animal y la actividad que realizaba con un factor de riesgo relativo de 1.68 en el caso de los équidos que se encuentran en la región costera y 2.17 para aquellos équidos que son utilizados para actividades de trabajo agrícola.

Palabras clave: piroplasmosis equina, piro A, piro B, prevalencia, factores de riesgo.

Abstract

Equine piroplasmosis is an endemic disease in tropical regions caused by two different species of hemoparasites, *Theileria equi* and *Babesia caballi*, primarily transmitted by ticks to horses, donkeys, and mules. This disease has negative economic repercussions for the equine industry due to reduced performance, increased mortality, and commercial restrictions in areas considered endemic. Rapid detection methods often struggle to successfully diagnose the disease at low parasitemia levels. Therefore, in this study, a polymerase chain reaction (PCR) test was employed using piro A and piro B primers for a more sensitive diagnosis. DNA was extracted from blood samples of equines, followed by the amplification of the 18S ribosomal RNA gene of the hemoparasites, with theoretical sizes of 423 and 396 base pairs for *Theileria equi* and *Babesia caballi*, respectively. Positive results were used to calculate the prevalence of equine piroplasmosis and identify risk factors through chi-square statistical analysis. The study revealed a 34.83% prevalence of the disease in the total sampled population, with the province of Manabí showing a higher incidence compared to Imbabura. The primary risk factors established were the animal's location and its activity. Specifically, equines located in coastal regions had a relative risk factor of 1.68, and those used for agricultural work had a relative risk factor of 2.17.

Keywords: equine piroplasmosis, piro A, piro B, prevalence, risk factors.

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

La piroplasmosis equina (PE), es causada por *Theileria equi* (*T.equi*) o *Babesia caballi* (*B.caballi*) que son transmitidas por catorce especies de garrapatas Ixodida especialmente de los géneros pertenecientes a *Dermacentor*, *Rhipicephalus* y *Hyalomma*, puede afectar a caballos, burros, mulas y cebras. La distribución y prevalencia de la enfermedad está relacionada estrechamente con la distribución de los vectores de transmisión, que son endémicos de regiones tropicales y subtropicales (Graham et al., 2022). Por lo que en pocos países en el mundo no se considera como una enfermedad endémica o autóctona, según Rothschild (2013) solo el 10% a nivel mundial de caballos se encuentran en regiones libres de EP. Estas regiones incluyen Estados Unidos, Canadá, Islandia, Reino Unido, Groenlandia, el norte de Europa, Irlanda, Singapur, Japón, Nueva Zelanda y Australia, aunque los cambios climáticos en esta regiones han hecho que aumente la supervivencia de las garrapatas transmisoras de PE y por ende los équidos sean más propensos a sufrir de la misma (Rothschild, 2013).

La PE es endémica en África, Asia, Centroamérica y América del Sur y partes del sur de Europa, con una prevalencia promedio que va desde el 20% al 90% en América Latina dependiendo del país, donde la prevalencia de *T. equi* es mayor que la de *B. caballi* (Posada-Guzmán et al., 2015). De acuerdo con Fidelis et al., (2019) existen grandes diferencias en la prevalencia alrededor de la región, en México, por ejemplo se encontró una prevalencia de 68% para *T. equi* y 55% de seroprevalencia para *B. caballi* y, en cambio en Chile se encontró una seroprevalencia de 23% para *T. equi* y 8% para *B. caballi*.

En regiones más cercanas a Ecuador, como Brasil diferentes informes indican una prevalencia que va del 2.1 % al 90.7 % y del 0.86 % al 90.8 % de *T. equi* y *B. caballi*, respectivamente. Y en países fronterizos como Colombia, de acuerdo a los estudios de Tenter et al., (1988) realizado en 82 caballos pertenecientes a 13 granjas se determinó una prevalencia de 94% para *T. equi* y 90% para *B. caballi* esto a través de una prueba de fijación del complemento.

En 2018 un estudio realizado por Vega Auz (2018) obtuvo como resultados una seroprevalencia de PE del 100%, siendo para *T. equi* del 94% y para *B. caballi* del 93.6%, y un 88,6% de casos simultáneos positivos, esto se determinó mediante cELISA, durante este estudio se muestreó a 334 équidos utilizados para labores en la extracción de palma africana en el cantón Quinindé, provincia de Esmeraldas. También en el 2019 otro estudio determinó la frecuencia de PE y los vectores implicados en la transmisión, pero esta vez en el cantón de Cata-mayo, provincia de Loja, las conclusiones del estudio evidenciaron que la prevalencia de la enfermedad en los caballos fue de 12.9%, en asnos el 6.3% y en mulas no se detectó la enfermedad, esto mediante microscopia directa con tinción Giemsa (Lapo, 2019).

En el año 2022 en el catón de Portoviejo se diagnosticaron 20 ejemplares equinos de raza de paso colombiano positivos de un total de 66 equinos muestreados, determinaron una prevalencia general de 30.3 % de EP en la provincia, esto a través de la técnica de frotis sanguíneo y tinción Giemsa (Pazmiño Cedeño, 2023).

T. equi y *B. caballi*, responsables de la PE, son parásitos con la capacidad de adherirse a los glóbulos rojos y destruirlos, lo que provoca fiebre, anemia, anorexia, pirexia, edema, hemoglobinuria, pérdida de peso, ictericia, hemólisis intravascular, acumulación de líquido en el abdomen, disminución del rendimiento, aborto en yeguas e incluso la muerte de los animales

infectados. Los casos pueden variar siendo algunos asintomáticos, peragudos, agudo, subagudo y crónica de PE, según Díaz-Sánchez et al., (2018), *T. equi* presenta una enfermedad clínica más grave que la de *B. caballi*, con tasas de letalidad documentadas varían de 10 a 50% (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2022).

Las pruebas diagnósticas más utilizadas para el diagnóstico de PE son técnicas parasitológicas, serológicas y moleculares (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2009). Las técnicas parasitológicas incluyen examen de frotis con tinción Giemsa o técnica de gota gruesa, la utilidad del examen microscópico es limitada debido a su baja sensibilidad, cuando el animal tiene una baja parasitemia (Malekifard et al., 2014).

Las técnicas serológicas incluyen Elisa indirecta, competitiva o prueba CFT, pero estas pruebas requieren de mucho tiempo y no pueden diferenciar el estado de infección en el que se encuentra el animal, por lo que no es posible utilizarlas para la detección de una infección activa, por esa razón se utilizan técnicas moléculas que incluyen los ensayos de PCR que se han demostrado que pueden ser sensibles, específicos y eficientes (Díaz-Sánchez et al., 2018), las técnicas moleculares además permiten diferenciar entre *T. equi* y *B. caballi*, esto es importante para proporcionar un tratamiento eficaz, especialmente en animales con infecciones mixtas por lo que hasta en la actualidad se siguen realizando investigaciones para mejorar la detección (Elsawy et al., 2021).

Justificación del problema

Según datos de INEC (2022), en Ecuador hasta el año 2021 se registra un número de 192 mil cabezas de ganado caballar y 67 mil cabezas de ganado mular, siendo Manabí una de las provincias que lidera el sector pecuario, con el 21.20 % del total nacional. Con un total de

30 081 cabezas de ganado mular, 26 284 cabezas de ganado caballar y 6 846 cabezas de ganado asnal.

La mayor parte del ganado se encuentra en las áreas rurales donde el ganado équido es utilizado para turismo, seguridad y trabajo especialmente para el transporte de material y cultivos. De acuerdo al estudio de Vega Auz (2018), en el cantón Quinindé, los pequeños y medianos productores principalmente dependen del uso de caballos, mulas y burros para poder llevar la palma africana desde los campos hasta sus hogares, normalmente en esta zonas la salud y bienestar del ganado équido suele pasar desapercibido por lo que existe una necesidad para mejorar la identificación, manejo y prevención de enfermedades que afectan negativamente la salud del animal como la PE, que causa un reducción del rendimiento y aumento en la mortalidad de los animales.

Además la PE, causada por los parásitos intracelulares pleomórficos de los géneros *Theileria* y *Babesia* en regiones endémicas es difícil de diagnosticar ya que los signos clínicos suelen ser inespecíficos y pueden confundirse fácilmente con otra enfermedad, mientras que los exámenes como el frotis de sangre y las pruebas serológicas convencionales no pueden evaluar si la infección se encuentra activa en el animal por lo que no son las herramientas más adecuadas para las evaluaciones epidemiológicas, siendo necesario la implementación de un correcto diagnóstico molecular que permita determinar si la infección se encuentra activa, además de diferenciar entre los dos agentes causantes de la PE (Posada-Guzmán et al., 2015).

Hay que recalcar también que pese a que la recuperación de los animales si es posible, los animales recuperados muchas veces se convierten en portadores durante largos periodos y es fundamental poder detectar correctamente y precisamente a estos animales para poder realizar un correcto control de la enfermedad (Tirosh-Levy, Steinman, et al., 2020).

La PE tiene consecuencias negativas a nivel económico para la industria equina debido a la reducción del rendimiento, la mortalidad y las restricciones comerciales, por lo que es clasificada según el Código Zoonosario de la OMSA como una enfermedad de declaración obligatoria (Díaz-Sánchez et al., 2018), siendo fundamental comprender la prevalencia y el impacto de la PE en Ecuador para poder implementar medidas de control efectivas para mitigar su impacto. Al investigar la prevalencia de la enfermedad y los factores de riesgo asociados, se puede contribuir a mejorar la salud y el bienestar equino en Ecuador. Este conocimiento puede ayudar en el diagnóstico temprano, el tratamiento y las estrategias de prevención para minimizar la carga de la enfermedad.

Objetivos

Objetivo general

Determinar la presencia de hemotrópicos (*Theileria equi* y *Babesia caballi*) en muestras sanguíneas de equinos provenientes de dos provincias del Ecuador, mediante la aplicación de técnicas de biología molecular (PCR), durante el período abril-agosto de 2023.

Objetivos específicos

- Obtener el ADN de las muestras de sangre de equinos mediante la utilización de un kit comercial.
- Detectar la presencia de *Theileria equi* (*T. equi*) y *Babesia caballi* (*B. caballi*) en las muestras de ADN de equinos mediante PCR de punto final.
- Determinar la prevalencia y factores de riesgo de la presencia de hemotrópicos en equinos, provenientes de dos provincias del Ecuador.

Hipótesis

La PCR de punto final permite identificar la presencia de *Theileria equi* (*T.equi*) y *Babesia caballi* (*B. caballi*) en muestras de sangre equina.

Capítulo II: Marco teórico

Piroplasmosis Equina

Definición

La piroplasmosis equina (PE), es una enfermedad cuyo vector son las garrapatas y puede afectar directamente a los caballos, mulas, burros y cebras. Los parásitos protozoarios identificados que causan la enfermedad pertenecen a los géneros *Theileria* y *Babesia*, principalmente por los hemoparásitos eucariotas *Theileria equi* y *Babesia caballi*. La PE es considerada una enfermedad de notificación obligatoria por la OMSA, ya que se estima que aproximadamente el 90% de la población mundial de caballos residen en áreas endémicas de la PE (Jaffer et al., 2010). La enfermedad se manifiesta en tres formas: aguda, subaguda y crónica, y los animales pueden actuar como portadores de los patógenos durante períodos prolongados sirviendo como fuente de infección para las garrapatas, que a su vez transmitieron los parásitos a otros equinos (Onyiche et al., 2019).

Origen

Esta enfermedad ha recibido varios nombres, como paludismo equino, fiebre de las garrapatas de caballo, fiebre del ántrax, fiebre biliar equina, teileriosis equina y babesiosis equina (Onyiche et al., 2019).

El primero en describir una fiebre en caballos, fue Wiltshire en 1883, a la cual llamó "fiebre de ántrax", causada por *Babesia equi*. Posteriormente, en 1901, Arnold resolvió diferenciar entre la enfermedad del caballo y la piroplasmosis equina. En ese mismo año, Laveran denominó a esta enfermedad *Piroplasma equi*, el nombre se produjo debido a la morfología del parásito intraeritrocitario encontrado en la sangre de los caballos y su similitud con la infección de paludismo en humanos. Poco después, quedó claro que dos patógenos distintos podrían ser responsables de esta enfermedad (Wise et al., 2013).

La piroplasmosis equina fue estudiada en detalle por primera vez en el sur de África debido a la aparición de la enfermedad en caballos importados a la región, se considera que las cebras son un reservorio importante de infección en África (Bhoora et al., 2020).

Se ha registrado que esta enfermedad también se descubrió en 1901 en la Indochina francesa en un gran grupo de mulas importadas para uso militar, y en 1908 en Cerdeña, donde un grupo de caballos introducidos desde Hungría mostraron signos clínicos de PE (Spickler, 2010).

En 1913 y 1917, se reportaron los primeros casos en el hemisferio occidental, en un caballo en el Canal de Panamá y en Barbados, respectivamente, se documentó un caso de un caballo importado que murió a causa de lo que parecía ser PE en Barbados, en las Indias Occidentales. Estas infecciones podrían haber resultado de importaciones desde áreas endémicas del Viejo Mundo (Tirosh-Levy, Gottlieb, et al., 2020). Agentes infecciosos

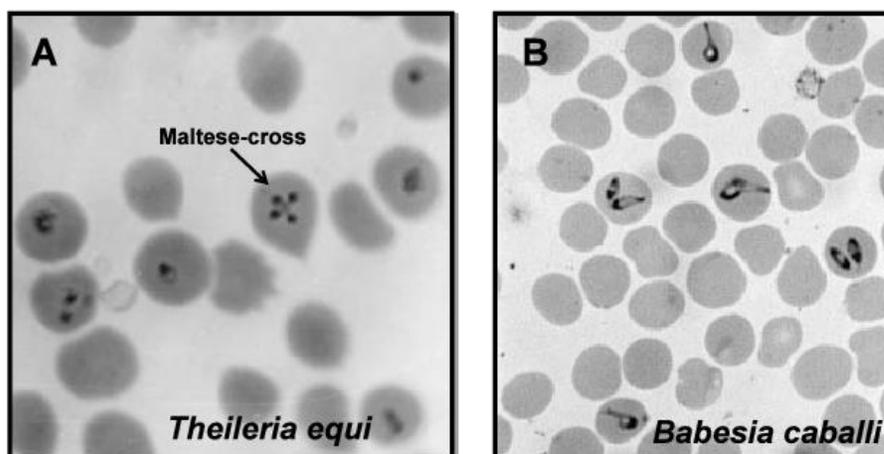
Los agentes infecciosos causantes de la PE son *B.caballi* y *T.equi*, que son protozoos intraeritrocíticos pertenecientes al filo Apicomplexa y al orden Piroplasmida cuya replicación sexual se da en la garrapata vector (gamogonia) y asexualmente en el equino (esporogonia)(Jaimés-Dueñez et al., 2023).

Los merozoítos de *T. equi* tienen una forma piriforme, redonda o ameboida. Con una longitud de 2 μm , forman un complejo de cuatro parásitos, en forma de cruz llamada "Cruz de Malta" (Malekifard et al., 2014).

En cambio en de *B.caballi* los merozoítos miden entre 2 y 5 μm de longitud. Un rasgo distintivo de la infección por *B. caballi* es la unión de los pares de merozoítos en sus extremos terminales, lo cual es una característica diagnóstica (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2021)

Figura 1

Observación de sangre con *T.equi* (A) y *B.caballi* (B) en eritrocitos.



Nota. Adaptado de “Una perspectiva sobre las infecciones por *Theileria equi* en burros” (p. 172), por Kumar, S., Kumar, R., & Sugimoto, C. (2009). Revista japonesa de investigación veterinaria, 56(4), 171–180.

Ciclo de vida

Los parásitos del grupo Piroplasmida, son transmitidos por garrapatas de los géneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus* y los menos frecuentes *Hyalomma* y *Amblyomma spp.* Se ha identificado que para *T. equi* hay 14 especies de las cuales 4 pertenecen al género *Dermacentor sp.*, 4 al género *Hyalomma sp.*, 5 al género *Rhipicephalus sp.*, y una a *cajennense* (Wise et al., 2013)

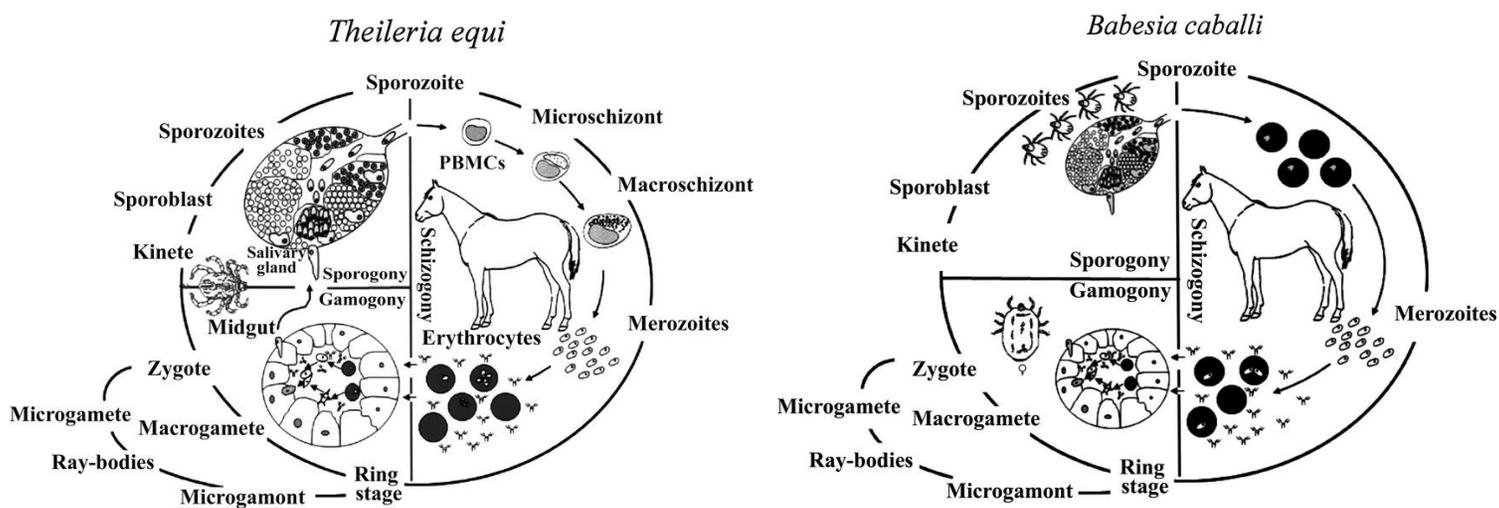
Mientras que existen 15 especies distintas de garrapatas que son vectores de *B caballi* de las cuales 7 pertenecen al género *Dermacentor sp.*, 6 al *Hyalomma sp.* y 2 *Rhipicephalus sp.*

El ciclo de vida consta así de tres etapas diferentes una etapa de reproducción asexual en las glándulas salivales (esporogonia) de la garrapata, una etapa de reproducción asexual en el huésped vertebrado (merogonia) y una reproducción sexual que implica la formación y fusión de gametos en el intestino de la garrapata (gemogonia), hay que tener en cuenta que para el

caso de *T. equi* existen una etapa adicional que involucra la esquizogonía en las células mono-nucleares de sangre periférica (Jalovecka et al., 2018). Es así que, la infección en el huésped comienza cuando los esporozoítos, transmitidos durante la picadura de la garrapata a través de su saliva, invaden las células sanguíneas. Los tipos de células sanguíneas que son objetivo de los esporozoítos varían según la especie de piroplasma (Rothschild, 2013). Los parásitos del género *Theileria* se caracterizan por llevar a cabo la esquizogonía en células sanguíneas nucleadas, como monocitos y linfocitos, antes de invadir los glóbulos rojos. Por otro lado, se cree que los parásitos del género *Babesia* se multiplican exclusivamente en los eritrocitos (Almazán et al., 2022).

Figura 2

Ciclo de vida de *T. equi* y *B. caballi* durante la infección en el equino y la garrapata vector.



Nota. Adaptado de "Revisión de la piroplasmosis equina" (p. 27), por Wise et al., 2013. Revista de Medicina Interna Veterinaria, 27 (6), 1334–1346.

- *T. equi*: comienza cuando los esporozoítos ingresa a un huésped a través de la se mordadura de la garrapata mientras se alimenta. Estos esporozoítos infectan las células mononucleares de la sangre periférica, hasta llegar a los merozoítos (Almazán et al., 2022). Los merozoítos son liberados y luego invaden los glóbulos rojos, donde ocurre la división asexual. Y el ciclo se vuelve a repetir. Algunos merozoítos se transforman en anillos, que se cree que son gamontes (Tamzali, 2013). Estos gamontes ingresan a la garrapata a través de los eritrocitos cuando se alimenta, llega al intestino medio de la garrapata y comienza otra vez su transformación. En la replicación sexual la fusión de estos gametos da lugar a cigotos. Estos cigotos forman kinetes internos que van a invadir el epitelio del intestino, donde a través de la hemolinfa llegan hasta las glándulas salivales (Bartolomé del Pino, 2017).
- *B. caballii*: la transmisión comienza cuando las garrapatas se alimentan y los esporozoítos invaden directamente los glóbulos rojos formando dos merozoítos con la peculiar forma de pera que parecen unidos. Cuando una garrapata se alimenta de sangre infectada y consume glóbulos rojos parasitados, algunos de los parásitos (merozoítos) se destruyen en el intestino medio de la garrapata, pero algunos sobreviven y se convierten en oocinetos que pasan por dos ciclos asexuales de multiplicación, comienzan a desarrollarse e infectar varios tejidos y huevos (Onyiche et al., 2019).

Transmisión

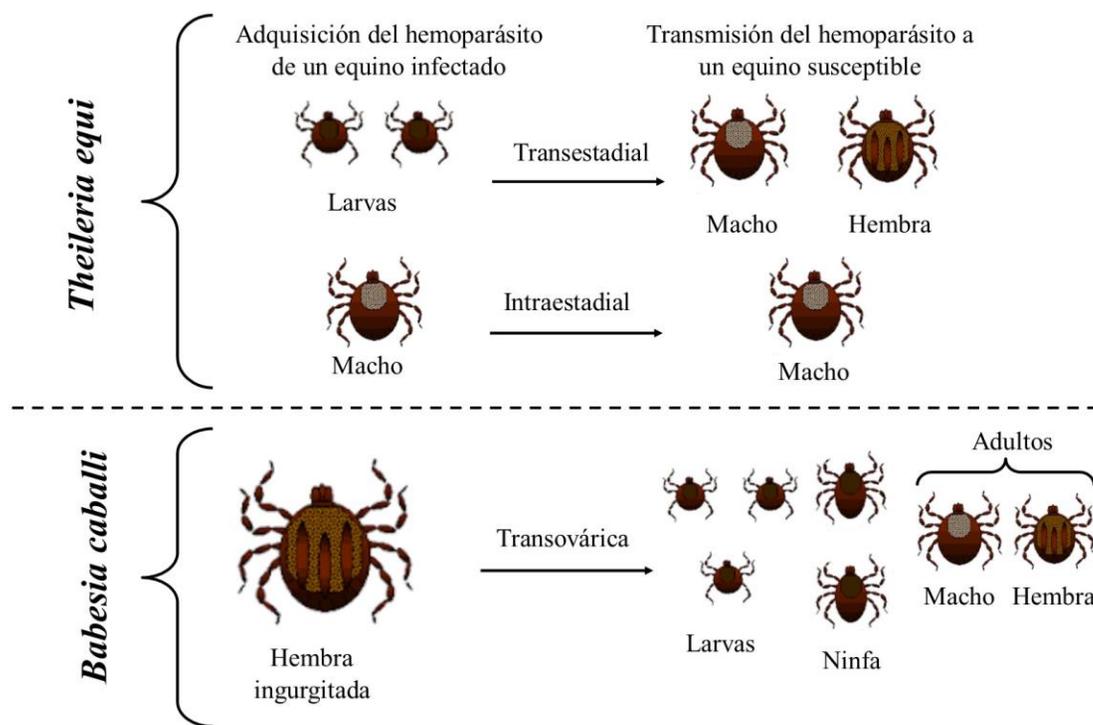
Una de las principales formas de transmisión de PE en equinos son las picaduras por garrapatas. Por un lado las garrapatas pueden transmitir el parásito de forma mecánica, que ocurre cuando las piezas bucales de las garrapatas están contaminadas y actúan como portadoras del agente patógeno o por transmisión biológica, que ocurre cuando los protozoos se desarrollan o se multiplican dentro de la garrapata vector y luego se transmiten al huésped (Taib Omer AL-Barwary & Jabar Aziz, 2020). El período de incubación de las enfermedades

agudas transmitidas por garrapatas esta alrededor de 12 a 19 días para *T. equi* y alrededor de 10 a 30 días para *B. caballi*. Los signos clínicos pueden observarse a los 5 a 7 días cuando los organismos se inoculan directamente en la sangre (Spickler, 2010).

Las garrapatas adquieren los parásitos *T. equi* o *B. caballi* por tres formas distintas: intraestadial, transtadial y transovárica (Tirosh-Levy, Gottlieb, et al., 2020). La transmisión intraestadial ocurre cuando la adquisición y transmisión del parásito se producen dentro un estadio del ciclo de vida de la garrapata (sin transición de etapa antes de la transmisión). Por otro lado, la transmisión transtadial describe la adquisición de la infección en una etapa de vida y después seguir con la capacidad de seguir propagando el parásito en las etapas posteriores de su vida, manteniendo así el parásito en su interior mientras se desarrolla. Por último, la transmisión transovárica se produce cuando la hembra adquiere los parásitos, los cuales ingresan a sus ovarios y se transmiten a la descendencia, permitiendo de esta manera el mantenimiento de los parásitos entre generaciones de garrapatas. *B. caballi* se transmite por vía transestadial y transovárica a través de sus vectores. *T. equi* generalmente se transmite a través de transmisión transestadial e intraestadial (Wise et al., 2013).

Figura 3

Modelo de transmisión de *T.equi* y *B.caballi*



Nota. Adaptado de "Piroplasmosis equina" (p. 172), por Díaz-Sánchez, Adrian & Roblejo-Arias, Lisset & Marrero-Perera, Roxana & Corona-González, Belkis. (2020). Revista de Salud Animal, Vol. 42, No. 1, enero-abril 2020, 56(4), 171–180.

La transmisión también puede ocurrir de manera iatrogénica, al compartir agujas entre caballos positivos y no infectados, pero el uso de cualquier equipo contaminado con sangre puede resultar en transmisión. Además, la infección puede ocurrir cuando los caballos crónicamente infectados donan sangre a caballos no infectados. La práctica ilegal conocida como dopaje de la sangre que consiste en transfusiones de sangre antes de una carrera estuvo relacionada con un brote de Florida en 2008 (Wise et al., 2013)

Síntomas

T. equi suele causar síntomas clínicos más graves que *B. caballi*, provocando hasta la muerte del animal, también provoca infecciones intrauterinas, que después causan abortos. (Sellon & Long, 2014). Las manifestaciones clínicas en PE son variables dependiendo de la forma en la que se presenta, esta puede ser:

1. Hiperaguda: es poco común y se caracteriza por la aparición de animales muertos. Se puede presentar hemoglobinuria y bilirrubinuria, la enfermedad puede presentarse de forma repentina y existen complicaciones debido al daño orgánico, que principalmente se ha visto en casos provocados por *B. caballi* donde se da la formación generalizada de coágulos sanguíneos y el desarrollo de una coagulación intravascular diseminada, también *B. caballi* (Zobba et al., 2008). Se observa una alta carga parasitaria y un bajo nivel de inmunidad protectora.
2. Aguda: forma más frecuente, se presenta fiebre alta (superior a 40 °C), anemia, ictericia, membranas mucosas congestionadas, dificultad para respirar, taquicardia, sudoración, edema en la región supraorbitaria y las extremidades, pérdida de apetito y ocasionalmente aparición de pequeñas manchas rojas y moradas en la piel (Wise et al., 2013). Además, se pueden observar orina de color oscuro y heces pequeñas y secas. En el caso de la infección aguda por *T. equi*, los signos clínicos suelen estar relacionados con una fuerte destrucción de glóbulos rojos y la consiguiente anemia.
3. Subaguda: Similar a la forma aguda, pero acompañada de pérdida de peso y fiebre intermitente. Las mucosas pueden tener un color que va desde el rosa pálido al rosa o del amarillo claro al amarillo brillante. También pueden aparecer petequias, equimosis y edemas en las extremidades distales. Se puede observar afectación en la motilidad intestinal y signos de cólico (Bartolomé del Pino, 2017).

4. Crónica: síntomas menos específicos, como una ligera falta de apetito, bajo rendimiento, pérdida de peso, agrandamiento del bazo y malestar general. Es más frecuente en burros y está asociada a una baja parasitemia (Bartolomé del Pino, 2017).

Otras presentaciones clínicas menos comunes incluyen neumonía secundaria, edema pulmonar, arritmias cardíacas, enteritis catarral, laminitis y enfermedades del sistema nervioso central que se caracterizan por ataxia, mialgia y convulsiones. En sementales, se ha observado infertilidad temporal o permanente. La insuficiencia renal aguda puede ocurrir como resultado de la nefropatía pigmentaria inducida por la hemoglobina, y las respuestas sistémicas a la inflamación severa (hipotensión) pueden empeorar la enfermedad renal. Las infecciones graves también pueden dar lugar a insuficiencia hepática o coagulación extravascular diseminada (Tamzali, 2013).

Hay que recalcar que las anomalías clínicas no son específicas de la enfermedad y pueden variar en su grado de aparición. Los caballos infectados con *T. equi* o *B. caballi*, tanto en áreas endémicas como no endémicas, a menudo son portadores asintomáticos sin signos visibles de enfermedad (Hines, 2018)

Distribución en América del Sur

La distribución actual de la PE está asociada directamente con la distribución de las garrapatas vectores y también los movimientos de los caballos de una región a otra desde su domesticación, por lo que la PE es considerada endémica en la mayor parte del mundo en especial en áreas tropicales y subtropicales (Qablan et al., 2013).

En las regiones donde los parásitos transmisores de PE son endémicos, como América del Sur, los animales se contagian con frecuencia en su juventud y desarrollan cierto nivel de resistencia. *T. equi* tiende a permanecer con el huésped de por vida, lo que lleva a un aumento en las tasas de prevalencia observada a medida que el huésped envejece, siendo el huésped el principal reservorio de este parásito. En cambio, la prevalencia de *B. caballi* no aumenta con

la edad y es más frecuente entre los animales más jóvenes. En el caso de *B.caballi* las garrapatas transmiten el parásito a través de su descendencia, lo que indica que las garrapatas son el principal reservorio de este parásito (Tirosh-Levy, Gottlieb, et al., 2020).

En Colombia según el estudio realizado por Jaimes-Dueñez et al. (2023) donde se analizaron molecularmente 280 caballos de los departamentos de Arauca, Meta y Santander se demostró una prevalencia de 25.7% para *T. equi* y no se encontraron animales positivos para *B. caballi*. Así mismo en el artículo de Agudelo-Ruíz et al. (2017) donde se analizaron caballos, asnos y mulas de los departamentos de Antioquia, Córdoba y Sucre el 13% de la población analizada fue positiva para piroplasmosis, y mediante la secuenciación de las muestras positivas se determinó la presencia de *T.equi*.

En Brasil mediante técnicas moleculares se determinó una prevalencia de 25.91% para *T. equi* y 2.74% para *B. caballi* en el estado de Mato Grosso en el medio oeste de Brasil donde la PE es considerada endémica (Schein et al., 2018). Otros estudios han revelado que la prevalencia dependiendo que varía entre el 21.6% al 100% para *T. equi*, mientras que para *B. caballi* varía del 54.1% al 93.2%(Costa et al., 2019) .

En Venezuela por su parte la epidemiología de la PE en áreas agroecológicas como Distrito Capital, Estado Miranda, Aragua Estado y Estado Carabobo, mediante ELISA competitivo se ha determinado una seroprevalencia global del 50.2% para PE, de donde se identificó que el 14.0% era de *T. equi*, 23.2% era de *B.caballi*, y un 13.0% fueron positivos para ambos parásitos, mientras que utilizando PCR se mostró una prevalencia de 66.2% distribuidas en 61.8% para *T.equi* y 4.4% para ambos parásitos (Rosales et al., 2013).

En Paraguay, donde los vectores de garrapatas que pueden transmitir *T. equi* y *B. caballi* son endémicas a través de la PCR se ha revelado que existe una prevalencia del 32.7%

de *T. equi* y 1.5% de *B. caballi*, así mismo se puede encontrar una prevalencia de 0.4% de portadores de ambas especies de parásitos. Los análisis realizados no muestran diferencias significativas en función de la raza de los caballos, su género o grupo de edad (Ahedor et al., 2023).

En Chile, se ha identificado la presencia de piroplasmosis equina (PE) en su forma subclínica, por lo que es obligatorio informar los casos. La mayoría de los informes sobre esta enfermedad en el país se han basado en estudios serológicos y han reportado tasas de prevalencia que varían entre el 0% y el 96% para *T. equi*, y entre el 0% y el 2% para *B. caballi* (Torres et al., 2021). En Argentina de acuerdo al estudio realizado por Sebastian et al. (2021) en la ciudad de Corrientes, 82% de un total de 42 caballos analizados dieron positivo a la presencia de piroplásmido 18S RNA, todas las muestras positivas se identificaron como *T. equi* mediante la amplificación del gen EMA-1.

Casi en todos los países de América del sur se puede encontrar casos PE, por lo que la enfermedad presenta una distribución amplia en la región, siendo *T. equi* la que mayor presencia y estudios tiene.

Diagnóstico

- **Diagnóstico parasitológico:** Se puede realizar la identificación del parásito en frotis de sangre delgados o gruesos teñidos con Giemsa o Leishman utilizando microscopios de luz. Se pueden realizar dos tipos de frotis, los frotis delgados se utilizan generalmente para la identificación de parásitos, pero los frotis de sangre gruesos pueden ser útiles para detectar organismos presentes en cantidades bajas (AZIZ & AL-BARWARY, 2019). Se puede utilizar esta técnica para poder detectar *T. equi* en animales gravemente enfermos, y en el caso de *B. caballi* también se puede utilizar pero con lleva mayor dificultad al tener una carga de parasitemia menor (Sumbria & Singla, 2015).
- **Diagnóstico serológico:** son considerados indirectos porque detectan los anticuerpos que produce el hospedero frente a la enfermedad, los más utilizados son IFI y ELISA.

La IFI se basa en la detección de anticuerpos específicos, el antígeno (merozoítos) se fijan a un portaobjetos y se coloca suero, en el caso de ser positivo se formara un complejo antígeno-anticuerpo, posteriormente se añade antiimmunoglobulinas marcadas con un fluorocromo, esta se une al complejo formado y el resultado se puede observar en un microscopio de fluorescencia (Montes, 2019).

En el caso de la prueba de ELISA, se ha desarrollado el iELISA y cELISA, donde se utilizan como antígeno las proteínas EMA-1 y EMA-2, así como la proteína RAP-1 de *B. caballi*, en cELISA para detectar la presencia de anticuerpos contra *T. equi* y *B. caballi* se utiliza suero obtenido a partir de muestras de sangre (Tirosh-Levy, Gottlieb, et al., 2020), el principio de la prueba consiste en la inhibición de la unión de un anticuerpo monoclonal primario en presencia de anticuerpos específicos, esta unión del anticuerpo monoclonal primario a la placa sensibilizada con el antígeno se detecta mediante un anticuerpo secundario que está unido a una enzima, llamada HRP. Se adiciona un sustrato enzimático para poder cuantificar, lo que hace que aparezca una coloración si es baja o nula no existe una inhibición del anticuerpo monoclonal primario, lo que sugiere la ausencia de anticuerpos contra *T. equi* o *B. caballi*, por el contrario si existe coloración indica una inhibición en la unión de los anticuerpos monoclonales primarios con el antígeno en la fase sólida, lo que indica la presencia de anticuerpos en la muestra (Vega, 2011).

Diagnóstico molecular: el diagnóstico molecular se basa en la detección del ADN del parásito en la sangre equina mediante la técnica de PCR. Estos métodos son más sensibles que el examen microscópico y clínicamente más útil que la serología, ya que permiten detectar una infección activa y actual (Tirosh-Levy, Gottlieb, et al., 2020). Existen varios tipos de PCR para el diagnóstico de piroplasmosis equina (EP) como: PCR convencionales, PCR anidada (nPCR), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y PCR en tiempo

real (qPCR) (Risso et al., 2022). Estas pruebas se centran en las secuencias diana principales, como el ARNr de SSU, el antígeno 1 de merozoíto de equi (EMA-1) y los genes de la proteína 1 asociada a la roptria (RAP-1). Estos métodos son altamente sensibles para el diagnóstico preciso de la PE con una alta sensibilidad, con un límite de detección de 10 a 7 % de eritrocitos parasitados, puede detectar ADN del parásito a partir de una muestra de sangre de 2.5 μ L con una parasitemia del 0.000001 % (Davitkov et al., 2016).

Los cebadores más usados para la detección y diferenciación entre los agentes infecciosos de PE, están dirigidos a:

- La proteína EMA-1, con un peso molecular de 30 KDa, candidato confiable para la detección de anticuerpos contra el parásito ya que los anticuerpos producidos en animales infectados muestran una fuerte reactividad hacia este antígeno. Esta proteína desempeña un papel crucial en el reconocimiento, unión y penetración de los eritrocitos del huésped, se ha demostrado que la EMA de los parásitos apicomplejos afecta la integridad de la red de espectrina-actina en la membrana de los eritrocitos (Ebrahimi et al., 2018).
- La proteína BC48, conocida como roptria de merozoítos de *B. caballii* con una masa molecular de 48kDa, situada en el cromosoma 3, es multicopia y no posee intrones. Esta proteína sirve de diana de unión de los anticuerpos durante la invasión de los merozoítos (Montes, 2019).
- El gen 18S rRNA, existe un alto grado de conservación de la secuencia la subunidad pequeña del ARN ribosómico entre las especies de *Babesia* y *Theileria*, al utilizar esta región permite la detección e identificación simultáneas de *T. equi* y *B. caballii*.

Capítulo III: Materiales y métodos

Participantes

La presente investigación fue realizada por Ana Belén Quillupangui Quinga, estudiante de la carrera de Biotecnología, bajo la tutoría de la Dra. María Augusta Chávez Larrea, M.Sc., docente e investigadora de la Carrera de Biotecnología, con la asesoría del Dr. Jorge Ron Román, Ph.D docente e investigador de la Carrera de Agropecuaria y el soporte técnico-científico de la Ing. Cristina Cholota, Técnica del Laboratorio de Biotecnología Animal, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Zona de estudio

El presente trabajo se realizó en equinos de las provincias de Manabí e Imbabura del Ecuador.

Duración de la investigación

El presente trabajo de titulación inició en mayo del 2023 y culminó en septiembre 2023

Obtención de las muestras de estudio

Las muestras de sangre equina fueron proporcionadas por el laboratorio de Mejora-
miento Genético y Sanidad Animal, ubicado en las instalaciones del IASA I Hacienda el Prado
Selva Alegre, Sangolquí.

Unidades de estudio

Se utilizaron 158 muestras de sangre equina, de las cuales 105 provenían de fincas ubi-
cadas en Manabí en los cantones de Santa Ana (n=7), Flavio Alfaro (n=6), Pedernales (n=2),
Chone (n=63) y 27 muestras de cantones desconocidos, las 53 muestras restante fueron reco-
lectadas en el Centro de Remonta del Ejército "IBARRA", ubicada en el Cantón Ibarra, en la
provincia de Imbabura. Adicionalmente se evaluó 50 muestras de sangre de burros y mulas, de
las cuales 7 muestras de sangre de mulas provenían de la provincia de Guayas, 27 muestras
de mulas de Manabí y 16 muestras de burros también de Manabí.

Trabajo de laboratorio

Extracción de ADN de Sangre Total mediante Kit

La extracción de ADN genómico se realizó mediante el kit de purificación GeneJET
Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (ThermoScientific, EE. UU.), con algunas modi-
ficaciones.

La lisis se realizó en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL donde se agregó 200 μ L de
sangre más 20 μ L de proteinasa k, y se colocó 400 μ L de solución de lisis, se realizó para cada
una mezclar con vórtex cada que se colocó un reactivo.

Posteriormente la incubación se realizó 50° C durante 10 minutos, se procedió a colocar 200 µL de etanol (96-100%) y se homogenizó con vórtex.

Para la obtención de ADN, se transfirió la mezcla a las columnas de centrifugación y se centrifugó durante 1 min a 8 000 rpm. Posterior a esto se realizó dos lavados con 500 µL de Wash Buffer I y 500 µL de Wash Buffer II, para el primer lavado se centrifugó durante 1 minuto a 10 000 rpm y para el segundo por 3 minutos a 14 000 rpm. El último paso fue la elución, para lo cual se transfirió la columna a un nuevo tubo de 1.5 ml y se fue colocando 50 µL, 25 µL y 12.5 µL de tampón de elución realizando una centrifugación de 1 minuto a 10000 rpm cada que se colocaba el tampón. El ADN obtenido se almacenó a -20 °C.

Integridad y cuantificación de ADN

La integridad del ADN se visualizó mediante electroforesis horizontal. En un gel de agarosa al 0.8% (p/v) disuelto en TBE 1X (Tris-Borato-EDTA), se cargó 3 µl de muestra con 1 µl de buffer de carga Blue Juice 10x, y teñido con SYBR® Safe 30% (v/v). Se corrió a 100 voltios durante 1 hora y se visualizó en un fotodocumentador.

La concentración se midió con el Multiskan FC, se cargó de 2 µl de muestra y se midió las absorbancia 260/280 y 260/230.

PCR punto final para la identificación de piroplasmosis equina.

Antes de empezar e identificar la presencia de piroplasmosis equina se realizó un análisis mediante BLAST, primer BLAST, FastPCR y Serial Cloner de los cebadores PRIO A: 5'-AATACCCAATCCTGACACAGGG-3' y PIRO B: 5'-TTAAATACGAATGCCCCCAAC-3'

Las condiciones de las reacciones y concentraciones se describen en la tabla se modificaron a partir del protocolo de Medina (2017),

Tabla 1

Componentes de la mezcla para la reacción de PCR para PE

Reacti- vos	Unidad	Stock	Concen- tración Fi- nal
H2O	μL	N/A	N/A
Buffer	X	10.00	1.00
PIRO A	μM	10.00	0.40
PIRO B	μM	10.00	0.40
Cl2Mg	mM	25.00	2.50
dNTP	μM	40.00	0,80
Taq	U/μL	5,00	0.50
ADN	ngr	50	100

Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos 1 ciclo, desnaturalización a 94°C durante 1 minuto 35 ciclos, hibridación del cebador a 61°C durante 1 minuto por 35 ciclos, extensión a 72°C durante 1 minuto por 35 ciclos, seguida. Los tamaños de los fragmentos amplificados fueron de 423 y 396 pb para *T.equi* y para *B.caballi*, respectivamente.

Electroforesis para los productos de PCR

Una vez realizada la amplificación se corrió una electroforesis en un gel de agarosa a 2% teñido con SYBR® Safe DNA Gel Stain a una concentración del 30% (v/v). En cada pocillo se cargó 9 μL del producto de PCR con 1 μL de 10X Blue Juice Invitrogen, y se corrió en una cámara de electroforesis a 100 V durante 1 hora, pasado ese tiempo la visualización del gel se realizó en un fotodocumentador (ChemiDoc Imaging System, Bio Rad, USA).

Purificación de productos de PCR

25 μ L del producto de PCR de muestras positivas para PE se dejaron correr en un gel de agarosa al 2% durante 1 hora a 100 V, para posteriormente ser cortadas en un transiluminador de luz azul (Safe Imager 2.0, Thermo Fisher Scientific, USA). Las bandas cortadas del gel se colocaron en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml presado previamente, y una vez colocadas las bandas cortadas el tubo se volvió a pesar para determinar el peso neto, con este dato se realizó los cálculos para saber qué cantidad de Solución de Unión a la Membrana se debía añadir (por cada 10mg de gel de agarosa se debía colocar 10 μ L de solución), se mezcló con ayuda de un vortéx durante 2 minutos y se procedió a incubar durante a 56°C durante 10 minutos, antes de retirar del Thermoshake AC, se observó que el gel estuviera completamente derretido, se volvió a mezclar con el vortéx y se transfirió el contenido a una columna SV se colocó en un tubo de recolección y se dejó 1 minutos a temperatura ambiente antes de centrifugar a 16.000 \times g por 1 minuto, posteriormente se realiza dos lavados con el primero a 500 μ L y el segundo con 700 μ L de Solución de Lavado de Membrana, en cada lavado se centrifugó primero a 16.000 \times g por 1 minuto y luego a 16.000 \times g por 5 minutos. Finalmente se realizó la elución, se colocó la columna en un nuevo tubo de 1.5 ml y se agregó primero 10 μ L de agua libre de Nucleasas, después 15 μ L de agua, en ambas ocasiones se centrifugó 2 minutos a 16.000 \times g, el producto obtenido se almacenó a -20°C.

Corte con enzimas de restricción AluI y HpaII.

Se utilizó el principio de RFLP con FastPCR y SerialCloner se buscaron dos enzimas que cortaran las secuencias teóricas de *T.equi* y *B.caballi* en diferentes fragmentos, se determinó que AluI, cortaba dos fragmentos de 215 y 144 pb para *B.caballi* y HpaII cortaba fragmen-

tos de 270 y 154 pb de *T.equi*. Una vez determinado los fragmentos donde iba a cortar las enzimas, se realizó una mezcla formada por 10 µL de producto de PCR, 7.3 µL de agua libre de nucleasas, 2 µL de 10X de buffer específico para cada enzima, 0,2 µL de Albúmina de suero bovino acetilada y 0.5 µL de enzima, para un volumen total de 20 µL. Se mezcló suavemente con la pipeta y se centrifugó por segundo, se incubó a 37°C por 1 hora en el termociclador, pasado el tiempo se corrió en un gel de agarosa al 2% durante 1 hora y se las bandas se visualizaron en el ChemiDoc Imaging System, Bio Rad, USA.

Manejo estadístico de los datos

Para el análisis estadístico de los datos se consideró la prevalencia solo de las muestras de Manabí e Imbabura, para los factores de riesgo solo se tomó en cuenta aquellos valores que cuenten con todos los factores reportados de tal manera que se excluyó los animales de los cuales se tenía información completa, reportando tanto la prevalencia y los factores de riesgo de la Piroplasmosis equina sin diferencias entre *T.equi* y *B.caballi*. Guayas no se tomó en cuenta para reportar datos ya que los datos se encuentran muy sesgados. Se utilizó los programas infostat y Excel para crear una base de datos de las variables. La prueba chi-cuadrado se utilizó para analizar si existe o no una relación entre las variables, las variables con una diferencia significativa ($p < 0.05$) se seleccionaron para identificar factores de riesgo, para eso se calculó los Intervalos de Confianza (IC) con un nivel de confianza del 95%. El factor de Riesgo Relativo (RR) y Riesgo Atribuible (RA) se lo sacó usando StatsDirect, con un intervalo de confianza del 95%.

El riesgo relativo y el riesgo atribuible se calcularon mediante la organización de los datos de la tabla 3.

Tabla 2

Modelo de tabla para el cálculo del riesgo relativo y el atribuible para todas las variables con una diferencia significativa ($p < 0.05$)

	Negati- vos	Positi- vos	Totales
Expuestos	a	b	a+b
No expues- tos	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+c+b+d

$$RR = \frac{\text{Incidencia Expuesto } (I_{e+})}{\text{Incidencia no expuesto } (I_{e-})} = \frac{\frac{a}{a+b}}{\frac{c}{c+d}}$$

Capitulo IV: Resultados

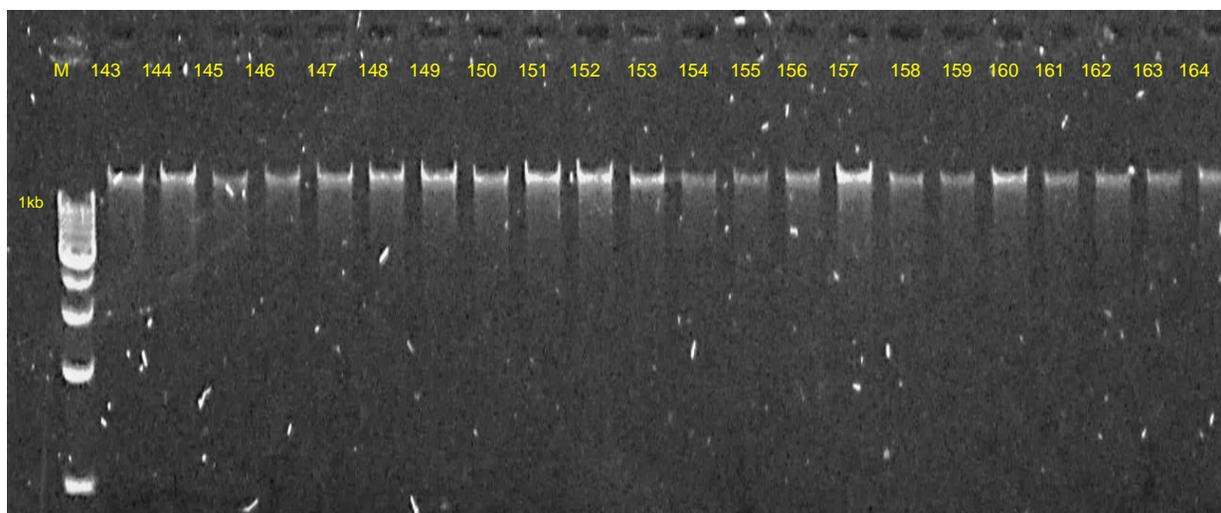
Integridad y cuantificación del ADN extraído de sangre entera equina mediante kit comercial

El kit comercial GeneJET Whole Blood Genomic para la extracción de ADN a partir de sangre entera dio un promedio de 34.44 ± 14.87 de concentración de ADN ($\mu\text{l/ml}$), con valores distribuidos entre 96.53 y 16.02 $\mu\text{l/ml}$. La pureza de OD de radio A260/280 (≥ 1.8 -2.1 pureza óptima, ≥ 1.6 -1.7 pureza aceptable) tuvo un promedio de 1.646 ± 0.183 , con un valor máximo de 2.477 y un valor mínimo de 1.061. La pureza de OD de radio A260/230 (> 2 -2.2 pureza óptima,

>1.8 pureza aceptable) tuvo un promedio de 1.0736 ± 0.643 con un valor máximo de 3.2650 y un valor mínimo de 0.2087. No obstante, al analizar la integridad del ADN mediante electroforesis, se identificaron franjas claras y prominentes. No se detectó evidencia de degradación ni de sustancias contaminantes, tal como se ilustra en la Figura 4.

Figura 4

Integridad del ADN obtenido a partir de sangre entera de caballo.



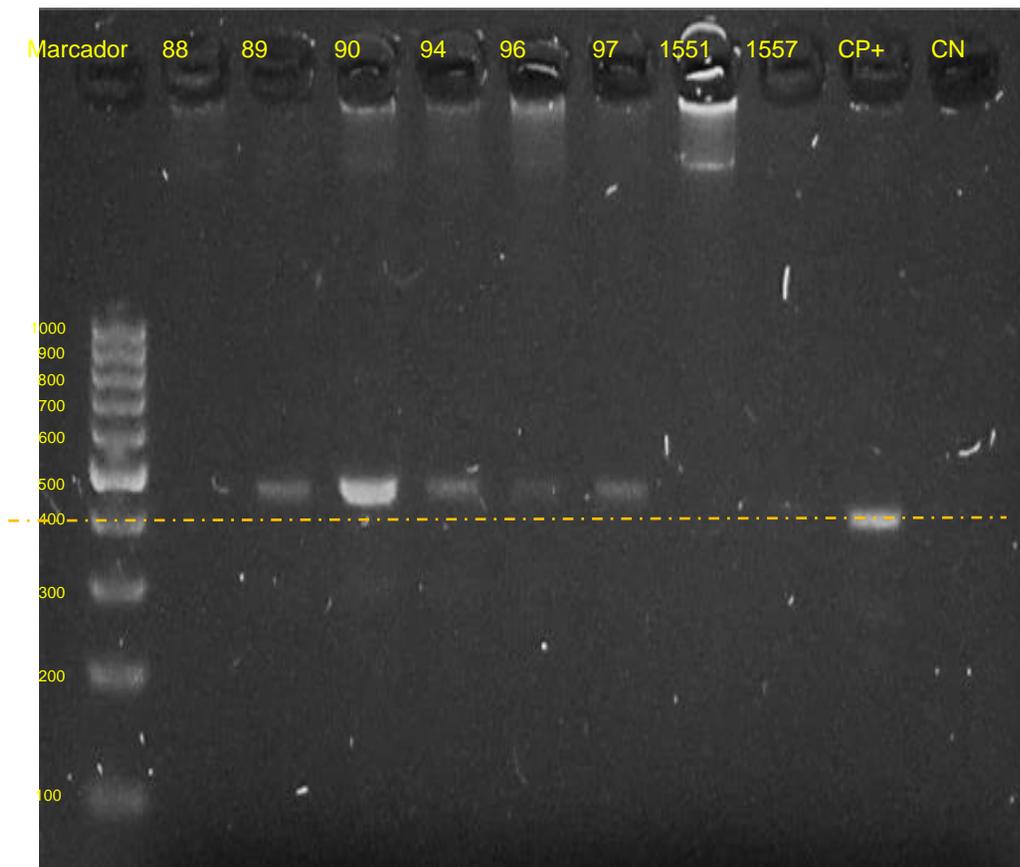
Nota: A partir del segundo pocillo en el gel de agarosa al 0.8%, se visualiza una parte del total de las muestras de ADN que fueron cargadas. En estas muestras, no se ha identificado evidencia de descomposición ni presencia de sustancias contaminantes. En el primer pocillo se observa el marcador de peso molecular (M) de 1 kb= 10 000 pb.

Diagnostico por PCR de *T.equi* y *B.caballi*

Los resultados de la PCR punto final dirigida al gen 18s RNA de *T.equi* y *B.caballi*, los tamaños teóricos de los amplicones para cada especie obtenidos mediante programas bioinformáticos FastPCR y Serial Cloner, fueron de 423 pb y 396 pb respectivamente, como se lo pudo observar en las figura 5 y figura 6.

Figura 5

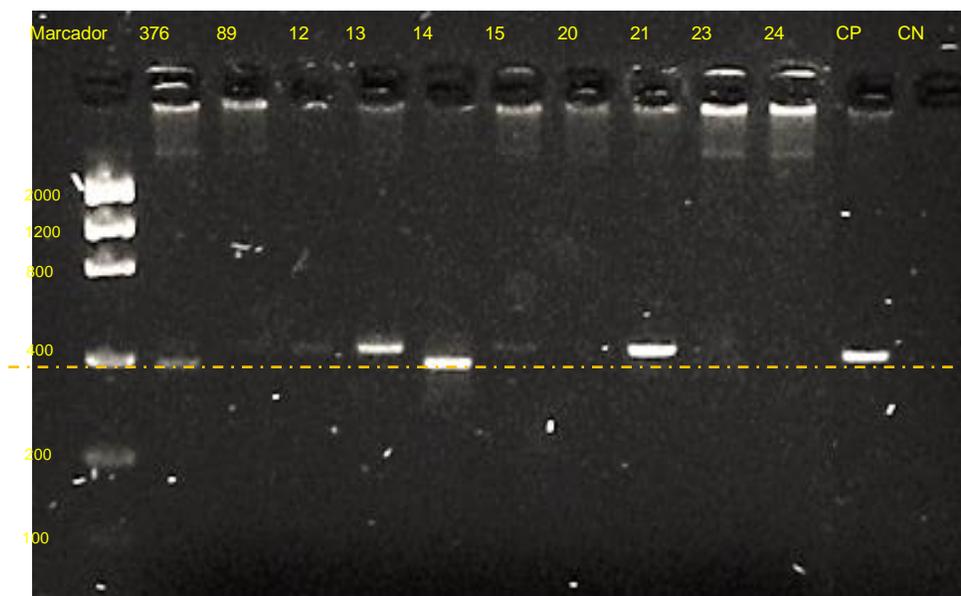
Resultados de la PCR con los cebadores piro A y Piro B con muestras positivas para *T.equi*



Nota: Se cargó muestras desde el segundo pocillo, las muestras se observan positivas para *T.equi*, con un tamaño teórico de 423 pb. Control positivo plásmido para *B.Bovis* de 377 pb (CP). Se utilizó un marcado de 100 pb

Figura 6

Resultados de la PCR punto final con los cebadores piro A y piro B, con muestras positivas para *B.caballi*

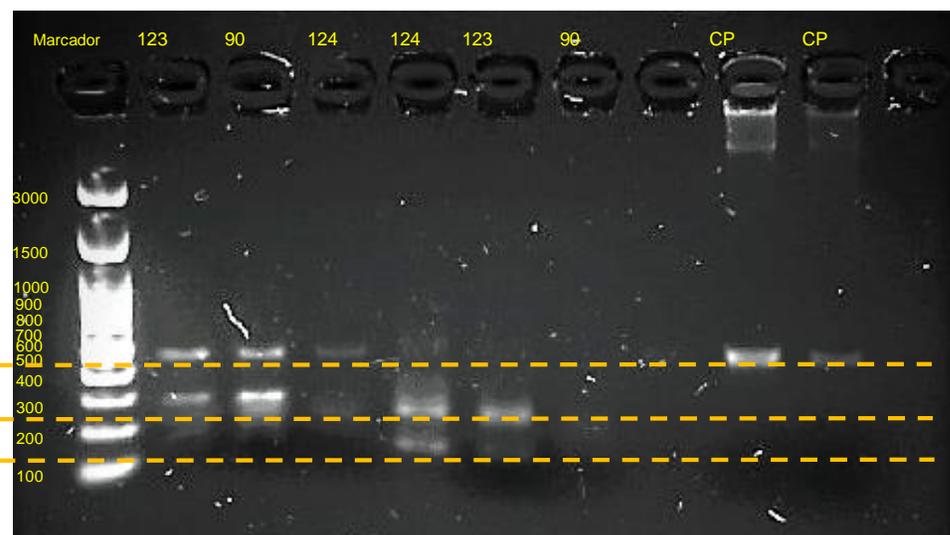


Nota: Se cargó muestras desde el segundo pocillo, la muestra 376 era positiva para *Babesia spp.* los cebadores piro A y piro B amplifican una porción de 408 pb. Se pueden observar muestras positivas para *T.equi* y muestras positivas para *B.caballi*, el control positivo utilizado fue el un plásmido para *B.Bovis* de 377 pb (CP). Se utilizó un marcado de masa baja de ADN de Invitrogen de rango de 100 pb a 2000 pb.

Para confirmara que los cebadores amplifiquen los fragmentos de 423 y 396 pb para *T.equi* y para *B.caballi* se realizó el RFLP con las enzimas HapII y AluI, en la figura 7 se muestran los fragmentos cortados. HapII cortó la secuencia en dos fragmentos un fragmento superior a los 400 pb y otro fragmento de 270 pb. AluI cortó las secuencias en 215 y 144 pb

Figura 7

Cortes con enzimas de restricción



Nota: Se cargó muestras desde el segundo pocillo, los tres primeros pocillos tiene cortes con la enzima HapII mientras que los tres siguientes son cortes con la enzima AluI, se utilizó un marcado 100 pb a 3000 pb, Se sugiere aumentar el tiempo de incubación y el tiempo de corrida en gel.

Prevalencia de PE de acuerdo a las variables analizadas

Del total de la población conformada por 208 équidos se obtuvo 75 muestras positivas para PE tomando en cuenta los animales de la provincia de Guayas. Excluyendo a la provincia de Guayas, de 201 muestras se obtuvo 70 muestras positivas repartidas entre Manabí e Imbabura, lo que indicó una prevalencia general de 34.83% de la enfermedad dentro de la población estudiada, la prevalencia repartida de acuerdo a las variables de localización y zootécnicas se muestra en la tabla 4.

Tabla 3

Prevalencia de PE de los équido estudiados.

Variables	Animales Muestreados	Negativos	Positivos	Prevalencia (%)
Ubicación				
Provincia				
Guayas	7	2	5	-

Imbabura	53	48	5	2.49
Manabí	148	83	65	32.34
Variables Zootecnia				
Sexo				
Hembra	127	82	45	22.39
Macho	66	41	25	12.44
Desconocido	8	8	0	0.00
Edad				
Potro	16	5	11	5.47
Yearling	8	6	2	1.00
Adolescente	20	12	8	3.98
Adulto	147	99	48	23.88
Desconocido	10	9	1	0.50
Especie				
Burro	16	14	2	1.00
Caballo	150	94	56	27.86
Mular	27	15	12	5.97
Desconocido	8	8	0	0.00
Actividad que realiza				
Exhibiciones y paseos	48	31	17	8.46
Reproducción	28	26	2	1.00
Salto/Polo	23	20	3	1.49
Trabajo agrícola y pecuario	63	24	39	19.40
Desconocido	39	30	9	4.48

Nota: En la tabla se observa la prevalencia de la PE por grupos de variables, para las variables zootécnicas se excluyen los animales de Guayas por sesgo en la población.

Determinación de los Factores de Riesgo para PE.

Para el estudio de los factores de riesgo los casos en los que se detectaron resultados positivos en todas las variables examinadas, se tomaron aquellas que por revisión bibliográfica se identificaron como posibles factores de riesgo relacionados con la frecuencia de la enfermedad.

Prueba de Chi-cuadrado para determinar la relación entre variables

Se aplicó una prueba de Chi-cuadrado, con valor crítico de 0.05 para observar los valores de chi-cuadrado y p valor <0.02, que indican si existía o no una diferencia significativa entre

las variables estudiadas para que puedan ser consideradas como un factor de riesgo. Las variables provincias y actividad que hace el équido fueron las únicas dos variables con un valor p menor a 0.05, con un valor de 0.0001, lo que indicó que si existe una relación entre la cantidad de animales positivos, la unificación y la actividad que realiza el animal, las otras variables al tener valores más altos que 0.05 indicó que no había una relación entre la presencia de animales positivos y la edad, sexo o especie.

Tabla 4

Cálculo del Chi cuadrado para las variables estudiadas.

Variables	Animales Muestreados	Negativos	Positivos	Prevalencia (%)	Chi cuadrado	Valor P<0,05	Existe o no una relación entre variables
Localización							
Provincia							
Costa	109	55	55	34.38	24.50	0.0001	Si existe una relación
Sierra	51	46	5	3.13			
Variables Zootecnia							
Sexo							
Hembra	102	63	39	24.38	0.06	0.798	No existe una relación
Macho	58	37	21	13.13			
Edad							
Potro	15	5	10	6.25	6.75	0.08	No existe una relación
Yearling	4	3	1	0.63			
Adolescente	11	6	5	3.13			
Adulto	130	86	44	27.50			
Especie							
Burro	9	7	2	1.25	1.46	0.4818	No existe una relación
Caballo	124	78	46	28.75			
Mular	27	15	12	7.50			
Actividad que realiza							
Exhibiciones y paseos	47	31	16	10.00	34.19	0.0001	Si existe una relación
Reproducción	28	26	2	1.25			
Salto/Polo	23	20	3	1.88			
Trabajo agrícola y pecuario	62	23	39	24.38			

Nota: Aquellas variables que tienen valores p menores a 0.05 se consideran que tienen una diferencia significativa por lo que esas variables si esta relacionadas con la que existan casos de piroplasmosis equina no es solo cuestión del azar.

Determinación del riesgo relativo y el riesgo atribuible

Se determinó el riesgo relativo para saber cuántas veces más es probable que aquellos animales expuestos al factor de riesgo tiene mayor tendencia de sufrir de piroplasmosis y se calculó el riesgo atribuible que indica, entre el grupo de expuestos o no al factor de riesgo, la fracción de ellos cuya enfermedad es atribuible al factor que se analiza. En tal tabla 6 se puede observar a que para las variables ubicación y actividad que realiza el animal existió un riesgo relativo de 1.68 y 2.17 respectivamente y que las otras variables no se consideran como factor de riesgo ya que en su intervalo de confianza estaba contenido el 1, que indico que no existe relación entre el factor y la piroplasmosis.

Tabla 5

Análisis del riesgo relativo y el riesgo atribuible.

Varia- bles	Animales Muestrea- dos	Negati- vos	Positi- vos	Prevalen- cia (%)	Riesgo Rela- tivo	Riesgo atribui- ble	Intervalo de confianza al 95%
Localización							
Provincia							
Costa	109	55	54	33.75	1.68	20.07	1.40-2.07
Sierra	51	46	5	3.13			
Variables Zootecnia							
Sexo							
Hembra	102	63	39	24.38	1.3	1.18	0.8-1.3
Macho	58	37	21	13.13			
Edad							
Adulto	130	86	44	27.50	0.85	-	0.7-1
Otro	30	14	16	10.00			
Especie							
Caballo	124	78	46	28.75	0.98	-	0.81-1.16

Otro	36	22	14	8.75			
Actividad que realiza							
Trabajo agrícola y pecuario	62	23	39	24.38	2.17	29.17	1.54-3.05
Otro	98	77	21	13.13			

Nota: Aquellas variables que dentro del intervalo de confianza al 95% tienen valor de 1 no se consideran como factor de riesgo, aquellas variables que tienen todo el intervalo de confianza inferior a 1 se consideran como factor protector, y las variables que tienen todo el intervalo de confianza superior a 1 se consideran como factor de riesgo.

Capítulo V: Discusión

El cebador objetivo del estudio fue obtener ADN mediante un kit comercial, se obtuvieron valores entre 16.02 y 96.53 $\mu\text{l/ml}$, esta diferencia se puede deber a dos circunstancias, la primera la cantidad de parasitemia que presente el animal y la segunda por fallas en el las co-

lumna de sílice. La parasitemia influye en la cantidad de ADN debido a que el ADN que se extrae de la sangre total proviene principalmente de los leucocitos que son células sanguíneas con núcleo y que se encuentran en circulación en todo momento, y la cantidad de estas células aumenta dependiendo de si existe o no un agente extraño que active el sistema inmunológico (Chacon-Cortes & Griffiths, 2014), es así que si los caballos se encuentran enfermos la cantidad de leucocitos va a aumentar y por ende la cantidad de ADN. Pero la parasitemia no solo aumenta la cantidad de ADN por el aumento de leucocitos sino también por la cantidad de patógenos que se encuentren en la muestra ya que durante el proceso de extracción también se va a obtener ADN del patógeno que se encuentran en el torrente sanguíneo, es así que si existe una gran carga parasitaria en especial de los hemoparásitos, la cantidad de ADN también va a variar, por ello es fundamental determinar de dónde se extra el ADN para el diagnóstico de una enfermedad (Flaherty et al., 2021). El segundo factor que puede afectar no solo la calidad sino también la cantidad de ADN son las fallas durante el proceso de extracción como la acumulación de hemoglobina, como lo nombra Zilinskiene, (2016), quien explica que al digerir muestras de sangre entera se puede provocar la acumulación de complejos de hemoglobina insolubles que tiñen y obstruyen la membrana, lo que reduce el rendimiento y la pureza.

Para una prueba diagnóstica de PCR la selección adecuada de los cebadores es posiblemente el aspecto más crucial para lograr la amplificación precisa del objetivo deseado, es esencial que los cebadores no compartan similitudes con otros objetivos en determinadas orientaciones y ciertas distancias, evitando así una amplificación no intencionada de PCR (Ye et al., 2012), considerando esto la Organización Mundial de Sanidad Animal, (2022) sugiere utilizar cebadores dirigidos para el gen 18s RNA de *T.equi* y *B.caballi*, justamente los cebadores Piro A y Piro B amplifican una región del gen 18s RNA tanto para *T.equi* como *B.caballi* que se determinó mediante el uso de herramientas bioinformáticas, por lo que se puede detectar con los cebadores piro A y piro B la presencia de piroplasmosis.

Al tener solo una diferencia de apenas 27 pb entre la secuencia amplificada para *T.equi* y la secuencia de *B.caballi*, la diferenciación en gel de agarosa no es completamente confiable ya que los tamaños son muy próximos, por lo que se complementa el diagnóstico con enzimas de restricción tal como hicieron Kumar et al., (2022) y Wang et al., (2019), que también utilizaron cebadores dirigidos a la región conservada 18s RNA y lograron concluir que los mismos amplicones se pueden utilizar para la identificación de especies que provocan piroplasmosis si se complementa con enzimas de restricción (RE) y que la PCR específica de especie se puede realizar únicamente en muestras positivas para piroplásmido, reduciendo el tiempo y el costo de las pruebas.

En el presente estudio se pudo evidenciar una prevalencia para piroplasmosis del 34.83%, lo que demuestra su presencia en el territorio nacional. Esta cifra encontrada es mayor si se compara con países vecinos como Colombia donde la prevalencia es de 18.25%, (Mujica et al., 2011), o en el caso de Costa Rica la prevalencia encontrada es del 6.2%, sin embargo si se compara con Brasil (76.98%) la prevalencia es menor, en este país piroplasmosis equina es considerada como endémica.

Los resultados obtenidos también mostraron una diferencia significativa para la provincia donde se analizaron y para la actividad que realiza el équido, siendo la prevalencia por provincia mayor en Manabí con 32.34% en relación a Imbabura con el 2.49% , según el análisis en el presente la provincia es considerada un factor de riesgo siendo aproximadamente cuatro veces mayor el riesgo de que un caballo en Manabí sufra de piroplasmosis que un caballo en Imbabura, esto posiblemente se debe a que Manabí es una provincia de la Región Costa en donde está presente la garrapata *Rhipicephalus microplus* vector de piroplasmosis (Orozco, 2018). Esto ya se ha evidenciado en otros estudios de América en donde los animales expuestos al vector son más susceptibles para adquirir piroplasmosis como lo demuestra Peckle et al. (2022) en sus estudios en Brasil donde concluye que *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es

un vector de *T. equi* y que su presencia en los caballos juega un papel importante en la prevalencia de PE.

La actividad que realiza el animal también mostró una diferencia significativa por lo que se consideró como un factor de riesgo de la enfermedad, la mayor prevalencia se encontró en animales que realizan el trabajo agropecuario (19.40%). Este resultado está acorde con lo encontrado en México donde se observó una prevalencia 25.3% en equinos dedicados al pastoreo (Trujillo, 2015) con un factor de riesgo de 1.4. El hecho de que los équidos utilizados para trabajo tengan una mayor prevalencia se debe al menor cuidado que se les da y al menor control de parásitos a diferencia de los caballos que son utilizados para deportes u otras actividades (Onyiche et al., 2019).

Los resultados obtenidos dependiendo del sexo, la especie y la edad del animal no mostraron diferencias significativas, por lo que no fueron un factor de riesgo para la enfermedad, esto es comparable con los estudios realizados de Ferreira et al., (2016), en Brasil donde se encontró que no existía diferencia significativa para las variables de edad y sexo cuyos valores de p fueron 0.658 y 0.245 respectivamente.

El presente estudio evidenció por primera vez la presencia de *B. equi* y *T. caballi* en una población equina del Ecuador mediante la aplicación de técnicas moleculares, esta información será útil para las entidades de control sanitario en el país para establecer medidas de vigilancia y control de la enfermedad.

Capítulo VI: Conclusiones

- Mediante la extracción de ADN se pudo definir una concentración óptima 96,53 y 16,02 µg/ml de sangre équida obtenida a partir de kit comercial.

- Los cebadores piro A y piro B amplifican fragmentos de 496 *T.equi* para y 323 pb *B.caballi* que se pueden cortar con las enzimas de restricción HapII y AluI para su diferenciación, comprobando así que estos cebadores pueden ser utilizados para el diagnóstico de piroplasmosis equina mediante PCR punto final.
- A través de la PCR se obtuvo una prevalencia de 34.83%, siendo Manabí la provincia con mayor cantidad de casos positivos con una prevalencia de 32.34%. Existieron dos variables la ubicación y la actividad que realiza el animal con un valores p menores al 0.05, por lo que se consideran como un factor de riesgo que incrementa la prevalencia de la enfermedad.
- Mediante este estudio se pudo evidenciar por primera vez *T.equi* y *B.caballi* mediante la aplicación de PCR en el Ecuador

Capítulo VII: Recomendaciones

- Se recomienda no colocar más de 200 µl de sangre de caballo para realizar la extracción de ADN mediante kit, para evitar que la acumulación de hemoglobina en la columna de sílice.
- Se recomienda realizar PCR específicas con cebadores que amplifiquen secuencias específicas de *T.equi* y *B.caballi* y la secuenciación de las muestras amplificadas para una mejor identificación de las dos especies causantes de piroplasmosis.
- Se recomienda aumentar el tiempo de digestión de más enzimas de restricción para mejorar el corte de los fragmentos al igual que aumentar el tiempo de corrida y disminuir la cantidad de marcado colocada.

Bibliografía

- Agudelo-Ruíz, Y., Acevedo-Gutiérrez, L., Montoya-Sánchez, A., T, L. P., & G, J. R. (2017). Identificación molecular de hemoparásitos transmitidos por garrapatas en equinos del Noroeste de Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 22(supl), Article supl.
<https://doi.org/10.21897/rmvz.1070>
- Ahedor, B., Sivakumar, T., Valinotti, M. F. R., Otgonsuren, D., Yokoyama, N., & Acosta, T. J. (2023). Detección por PCR de *Theileria equi* y *Babesia caballi* en caballos aparentemente sanos en Paraguay. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 39, 100835. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2023.100835>
- Almazán, C., Scimeca, R. C., Reichard, M. V., & Mosqueda, J. (2022). Babesiosis and Theileriosis in North America. *Pathogens*, 11(2), 168. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020168>
- AZIZ, K. J., & AL-BARWARY, L. T. O. (2019). Epidemiological Study of Equine Piroplasmiasis (*Theileria equi* and *Babesia caballi*) by Microscopic Examination and Competitive-ELISA in Erbil Province North-Iraq. *Iranian Journal of Parasitology*, 14(3), 404-412.
- Bartolomé del Pino, L. (2017). *Situación epidemiológica y clínica de la piroplasmiasis equina en áreas endémicas como las penínsulas Itálica e Ibérica* [Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/45711/1/T39447.pdf>
- Bhoora, R. V., Collins, N. E., Schnittger, L., Troskie, C., Marumo, R., Labuschagne, K., Smith, R. M., Dalton, D. L., & Mbizeni, S. (2020). Molecular genotyping and epidemiology of equine piroplasmids in South Africa. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11(2), 101358. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101358>
- Chacon-Cortes, D., & Griffiths, L. R. (2014). Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: Current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*, 2, 1-9. <https://doi.org/10.2147/BSAM.S46573>

- Costa, S. C. L., Freitas, J. de S., Silva, A. N. da, Lacerda, L. C., Cruz, R. D. S., Carvalho, F. S., Pereira, M. J. S., & Munhoz, A. D. (2019). Frecuencia y factores asociados con *Theileria equi*, *Babesia caballi* y *Trypanosoma evansi* en équidos de Bahía (Noreste de Brasil). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28, 47-58. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180090>
- Davitkov, D., Vucicevic, M., Stevanovic, J., Krstic, V., Slijepcevic, D., Glavinic, U., & Stanimirovic, Z. (2016). Molecular detection and prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses of central Balkan. *Acta Parasitologica*, 61(2), 337-342. <https://doi.org/10.1515/ap-2016-0044>
- Díaz-Sánchez, A. A., Pires, M. S., Estrada, C. Y., Cañizares, E. V., del Castillo Domínguez, S. L., Cabezas-Cruz, A., Rivero, E. L., da Fonseca, A. H., Massard, C. L., & Corona-González, B. (2018). First molecular evidence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Cuba. *Parasitology Research*, 117(10), 3109-3118. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6005-5>
- Ebrahimi, M., Hamidineja, H., Tanabandeh, M. R., Razi Jalali, M. H., & asouli, A. (2018). Cloning and Expression of Immunogenic Regions of EMA-1 Gene of *Theileria equi* From Infected Horses. *Kowsar*, 4, 209-303. Archives of Razi Institut.
- Elsawy, B. S. M., Nassar, A. M., Alzan, H. F., Bhoora, R. V., Ozubek, S., Mahmoud, M. S., Kandil, O. M., & Mahdy, O. A. (2021). Rapid Detection of Equine Piroplasms Using Multiplex PCR and First Genetic Characterization of *Theileria haneyi* in Egypt. *Pathogens*, 10(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111414>
- Ferreira, E. P., Vidotto, O., Almeida, J. C., Ribeiro, L. P. S., Borges, M. V., Pequeno, W. H. C., Stipp, D. T., de Oliveira, C. J. B., Biondo, A. W., Vieira, T. S. W. J., & Vieira, R. F. C.

- (2016). Serological and molecular detection of *Theileria equi* in sport horses of north-eastern Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 47, 72-76. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.06.004>
- Fidelis, O. L., Sampaio, P. H., Gonçalves, L. R., André, M. R., Machado, R. Z., Wijffels, G., & Cadioli, F. A. (2019). Comparison of conventional and molecular techniques for *Trypanosoma vivax* diagnosis in experimentally infected cattle. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28, 203-209. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019034>
- Flaherty, B. R., Barratt, J., Lane, M., Talundzic, E., & Bradbury, R. S. (2021). Sensitive universal detection of blood parasites by selective pathogen-DNA enrichment and deep amplicon sequencing. *Microbiome*, 9, 1. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00939-1>
- Graham, H., van Kalsbeek, P., van der Goot, J., & Koene, M. G. J. (2022). Low seroprevalence of equine piroplasmiasis in horses exported from the Netherlands between 2015 and 2021. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.954046>
- Hines, M. T. (2018). Clinical Approach to Commonly Encountered Problems. *Equine Internal Medicine*, 232-310. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44329-6.00007-3>
- INEC. (2022). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua* (pp. 9-28). https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2021/Principales%20resultados-ESPAC_2021.pdf
- Jaffer, O., Abdishakur, F., Hakimuddin, F., Riya, A., Wernery, U., & Schuster, R. K. (2010). A comparative study of serological tests and PCR for the diagnosis of equine piroplasmiasis. *Parasitology Research*, 106(3), 709-713. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1669-5>
- Jaimes-Dueñez, J., Jiménez-Leaño, Á., Enrique-Niño, S., Arias-Landazábal, N., Bedoya-Ríos, M., & Rangel-Pachón, D. (2023). Aspectos clínico-epidemiológicos de la infección por las especies *Babesia*, *Theileria* y *Trypanosoma* en equinos del noreste de Colombia.

Ticks and Tick-borne Diseases, 14(6), 102208.

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102208>

Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., & Malandrín, L. (2018). The Complexity of Piroplasms Life Cycles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00248>

Kumar, B., Maharana, B. R., Thakre, B., Brahmbhatt, N. N., & Joseph, J. P. (2022). 18S rRNA Gene-Based Piroplasmid PCR: An Assay for Rapid and Precise Molecular Screening of Theileria and Babesia Species in Animals. *Acta Parasitologica*, 67(4), 1697-1707.

<https://doi.org/10.1007/s11686-022-00625-2>

Lapo, S. (2019). *Determinación de la frecuencia de piroplasmosis equina y de los vectores implicados en la transmisión, en el cantón Catamayo, provincia de Loja* [Universidad Nacional de Loja]. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/22511/1/STE-FANY%20YADIRA%20LAPO%20ROJAS.pdf>

Medina, V. (2017). Diagnóstico de los Hemotrópicos Anaplasma Marginale, Trypanosoma spp. Y Babesia spp. En tres fincas ganaderas de la prinvinca de Pastaza, Ecuador. *Revista Científica FCV-LUZ*, XXVII(3), 162-171.

Montes, G. (2019). *Aportaciones al diagnóstico serológico y molecular de la Piroplasmosis equina* [Universidad de Extremadura]. <https://dehesa.unex.es/handle/10662/9733>

Mujica, F. F., Perrone, T., Forlano, M., Coronado, A., Meléndez, R. D., Barrios, N., Álvarez, R., & Granda, F. (2011). Prevalencia serológica de Babesia caballi y Theileria equi en equinos del Estado Lara, Venezuela. *Veterinary Parasitology*, 178(1), 180-183.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.036>

- Onyiche, T. E., Suganuma, K., Igarashi, I., Yokoyama, N., Xuan, X., & Thekiso, O. (2019). A Review on Equine Piroplasmiasis: Epidemiology, Vector Ecology, Risk Factors, Host Immunity, Diagnosis and Control. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/ijerph16101736>
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2022). Equine Piroplasmiasis. En *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2022*. Organización Mundial de Sanidad Animal. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.06.08_Piroplasmiasis_equina.pdf
- Orozco, G. (2018). *Distribución espacial de garrapatas que afectan a las ganaderías ecuatorianas de las tres regiones, usando como referencia la línea equinoccial*. Universidad Central del Ecuador.
- Pazmiño Cedeño, L. (2023). *Determinación de prevalencia de piroplasmiasis en equinos de paso colombiano mediante frotis sanguíneo*. [Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí]. https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/2094/1/TIC_MV25D.pdf
- Peckle, M., Santos, H., Pires, M., Silva, C., Costa, R., Vitari, G., Camilo, T., Meireles, N., Paulino, P., & Massard, C. (2022). Dynamics of *Theileria equi* Infection in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* during the Parasitic Phase in a Chronically Infected Horse. *Pathogens*, 11(5), 525. <https://doi.org/10.3390/pathogens11050525>
- Posada-Guzmán, M. F., Dolz, G., Romero-Zúñiga, J. J., & Jiménez-Rocha, A. E. (2015). Detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Blood from Equines from Four Indigenous Communities in Costa Rica. *Veterinary Medicine International*, 2015, e236278. <https://doi.org/10.1155/2015/236278>

- Qablan, M. A., Oborník, M., Petrželková, K. J., Sloboda, M., Shudiefat, M. F., Hořín, P., Lukeš, J., & Modrý, D. (2013). Infecciones por Babesia caballi y Theileria equi en équidos jordanos: Epidemiología y diversidad genética. *Parasitology*, *140*(9), 1096-1103.
<https://doi.org/10.1017/S0031182013000486>
- Risso, A., Campos, G., Garcia, H., & Zerpa, H. (2022). Insights into equine piroplasmiasis in Venezuelan sport horses: Molecular diagnosis, clinical, and cardiovascular findings. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, *27*, 100666.
<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100666>
- Rosales, R., Rangel-Rivas, A., Escalona, A., Jordan, L. S., Gonzatti, M. I., Aso, P. M., Perrone, T., Silva-Iturriza, A., & Mijares, A. (2013). Detección de Theileria equi y Babesia caballi infecciones en caballos venezolanos mediante ELISA de Inhibición Competitiva y PCR. *Veterinary Parasitology*, *196*(1), 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.004>
- Rothschild, C. M. (2013). Equine Piroplasmiasis. *Journal of Equine Veterinary Science*, *33*(7), 497-508. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.03.189>
- Schein, F. B., Maia, M. O., Witter, R., Marcili, A., Camargo, L. M. de, Dutra, V., Nakazato, L., Candido, S. L., Almeida, E. M. de, Oliveira, A. C. S. de, & Pacheco, R. de C. (2018). Estudio molecular y diversidad genética de piroplásmidos en équidos del Medio Oeste de Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, *27*, 464-472.
<https://doi.org/10.1590/S1984-296120180048>
- Sebastian, P. S., Benitez-Ibalo, A. P., Flores, F. S., Debárbora, V. N., Martinez, E. I., Thompson, C. S., & Mangold, A. J. (2021). Detección molecular y caracterización filogenética de Theileria equi en caballos (Equus caballus) de un área periurbana de Argentina. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *12*(6), 101810.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101810>

- Sellon, D. C., & Long, M. T. (2014). *Equine Infectious Diseases* (Segunda). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/C2010-0-67112-4>
- Spickler, A. R. (2010). *Piroplasmosis Equina*.
- Sumbria, D., & Singla, L. D. (2015). Recent Diagnostic and control approaches in Equine piroplasmosis. *Veterinaria*, 2, 1-6.
- Taib Omer AL-Barwary, L., & Jabar Aziz, K. (2020). Molecular Identification of *Theileria equi* and *Babesia caballi* from Ixodid Ticks Infesting Equids in Erbil Province, Northern of Iraq. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 8(12). <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2020/8.12.1286.1293>
- Tamzali, Y. (2013). Equine piroplasmosis: An updated review: Equine piroplasmosis: an updated review. *Equine Veterinary Education*, 25(11), 590-598.
<https://doi.org/10.1111/eve.12070>
- Tenter, A. M., Otte, M. J., Gonzalez, C. A., & Abuabara, Y. (1988). Prevalence of piroplasmosis in equines in the Colombian province of Cordoba. *Tropical Animal Health and Production*, 20(2), 93-98. <https://doi.org/10.1007/BF02242234>
- Tirosh-Levy, S., Gottlieb, Y., Fry, L. M., Knowles, D. P., & Steinman, A. (2020). Veinte años de investigación sobre la piroplasmosis equina: Distribución mundial, diagnóstico molecular y filogenia. *Pathogens*, 9(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110926>
- Tirosh-Levy, S., Steinman, A., Levy, H., Katz, Y., Shtilman, M., & Gottlieb, Y. (2020). Parasite load and genotype are associated with clinical outcome of piroplasm-infected equines in Israel. *Parasites & Vectors*, 13(1), 267. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04133-y>
- Torres, R., Hurtado, C., Pérez-Macchi, S., Bittencourt, P., Freschi, C., de Mello, V. V. C., Machado, R. Z., André, M. R., & Müller, A. (2021). Ocurrencia y Diversidad Genética de *Babesia caballi* y *Theileria equi* en Caballos Pura Sangre de Carreras Chilenos. *Pathogens*, 10(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060714>

- Trujillo, M. (2015). *Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a piroplasmosis en équidos de tres regiones en el estado de Veracruz, México*. Universidad de Veracruz.
- Vega Auz, P. (2018). *Seroprevalencia de Piroplasmosis Equina en equinos de trabajo del cantón Quinindé en Esmeraldas, Ecuador* [Universidad San Francisco de Quito USFQ]. <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/7255/1/138066.pdf>
- Vega, C. (2011). *Seroprevalencia de piroplasmosis equina en caballos mantenidos en cuadra y caballos destinados a matadero en Costa Rica*. [Universidad Nacional Facultad de Ciencias de la Salud Escuela de Medicina Veterinaria]. <https://repositorio.una.ac.cr/bitstream/handle/11056/12955/Cinthy-Alexandra-Vega-Bola%C3%B1os.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Wang, J., Liu, J., Yang, J., Wang, X., Li, Z., Jianlin, X., Li, X., Xiang, Q., Li, Y., Liu, Z., Luo, J., Guan, G., & Yin, H. (2019). The first molecular detection and genetic diversity of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses of Gansu province, China. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 10(3), 528-532. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.01.003>
- Wise, L. n., Kappmeyer, L. s., Mealey, R. h., & Knowles, D. p. (2013). Review of Equine Piroplasmosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(6), 1334-1346. <https://doi.org/10.1111/jvim.12168>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Zobba, R., Ardu, M., Niccolini, S., Chessa, B., Manna, L., Cocco, R., & Pinna Parpaglia, M. L. (2008). Clinical and Laboratory Findings in Equine Piroplasmosis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28(5), 301-308. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2008.03.005>

